

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sonja Kralj

**Genotoksičnost u inak sedimenta Rije kod zaljeva na staništu
kulturu ribljih hepatocita PLHC-1 mjeren Komet testom**

Diplomski rad

Zagreb, 2010. godina

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za ekotoksikologiju Zoologijskog zavoda te u Laboratoriju Zavoda za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Gorana I. V. Klobučara, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja prof. biologije i dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

ZAHVALE

Srda no zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Goranu I. V. Klobu aru na vodstvu i razumijevanju pri izradi ovog diplomskog rada. Posebno zahvaljujem dipl. ing. Maji Šrut na stru nim savjetima, nesebi noj pomo i i podršci prilikom izrade i pisanja rada. Najljepše zahvaljujem dr. sc. Luki Traveni na materijalima potrebnima za izradu ovog rada, i svim djelatnicima Zoologijskog zavoda te Zavoda za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matemati kog fakulteta, koje nisam posebno navela, a koji su svojim savjetima i preporukama pridonijeli izradi ovog rada. Hvala svim kolegama i prijateljima koji su studij u inili ljepšim i zanimljivijim, posebno Ivani Dubove ak i Martini Kobeti . Najve e hvala mojoj obitelji: roditeljima, bratu i sestri, na podršci i razumijevanju tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

GENOTOKSINI U RAZLIČNIM SEDIMENTIMA RIJE KOD ZALJEVA NA STANICAMA KULTURE RIBLJIH HEPATOCITA PLHC-1 MJERENI KOMET TESTOM

Sonja Kralj

Zoologijski zavod
Biološki odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Sveučilište u Zagrebu
Rooseveltova trg 6, Zagreb

Brojni toksini onečištiva i antropogenog porijekla mogu se akumulirati u morskim sedimentima i kasnije prije i u vodene organizme te izazvati toksine u inak. Procjena genotoksičnosti u inak onečišćenih sedimenata na stanicama kulturama može poslužiti kao rani pokazatelj negativnih promjena u okolišu. U ovom je radu genotoksičnost uzoraka sedimenata prikupljenih na šest postaja različitog stupnja onečišćenja u Rije kod zaljeva istražena komet testom na stanicama linije ribljih hepatocita PLHC-1. PLHC-1 stanice bile su izložene različitim koncentracijama organskih ekstrakata sedimenata tijekom 24 h. Svih šest uzoraka sedimenata pokazali su genotoksičnost u inak ovisan o koncentraciji. Kako bi se odredilo koja je grupa onečištiva najvećinom odgovorna za opaženu genotoksičnost, sediment s najvećom genotoksičnošću dodatno je ekstrahirao s tri otapala različitog stupnja polarosti. Nepolarna otapala (cikloheksan, diklormetan) pokazala su veću genotoksičnost nego polarno otapalo (metanol), dok je najveća genotoksičnost pokazao sediment ekstrahirao smjesom otapala diklormetan-metanolom koja ekstrahira široki spektar onečištiva. Komet test na stanicama kulture PLHC-1 pokazao se kao prikladna metoda procjene genotoksičnosti sedimenata.

(42 stranice, 17 slika, 7 tablica, 63 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: sediment, genotoksičnost, komet test, PLHC-1 stanice na liniji

Voditelj: Dr. sc. Göran I. V. Klobučar, red. prof.

Pomoćni voditelj: dipl. ing. Maja Šrut, asist.

Ocjenitelji: Dr. sc. Göran I. V. Klobučar, red. prof.

Dr. sc. Zdravko Dolenec, red. prof.

Dr. sc. Mirjana Pavlica, red. prof.

Rad prihvaćen: 15. rujna 2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

GENOTOXIC EFFECT OF RIJEKA BAY SEDIMENTS ON PLHC-1 FISH HEPATOMA CELL CULTURE ASSESSED BY THE COMET ASSAY

Sonja Kralj

Department of Zoology
Faculty of Science
University of Zagreb
Rooseveltova trg 6, Zagreb, Croatia

Numerous toxic anthropogenic pollutants can accumulate in marine sediments and, later on, enter the aquatic organisms and cause toxic effects. Assessment of genotoxic effects of contaminated sediments using cell culture can serve as an early indicator of negative alterations in the environment. In this study, the genotoxicity of sediment samples collected at the six sites of different pollution intensity in the Rijeka Bay was assessed by the Comet assay on PLHC-1 fish hepatoma cell line. PLHC-1 cells were exposed to different concentrations of organic sediment extracts for 24 h. All of the six sediment samples showed a concentration dependent genotoxic effect. In order to determine which group of pollutants is mostly responsible for the observed genotoxicity, the sediment that demonstrated highest genotoxicity was additionally extracted with three solvents which differ by the degree of polarity. Nonpolar solvents (cyclohexane, dichloromethane) revealed higher genotoxicity than the polar solvent (methanol), while the highest genotoxicity was obtained by the sediment extracted using a solvent mixture dichloromethane-methanol which extracts a wide range of pollutants. Comet assay on PLHC-1 cell culture proved to be an advantageous method of sediments genotoxicity assessment.

(42 pages, 17 figures, 7 tables, 63 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central biological library

Key words: sediments, genotoxicity, Comet assay, PLHC-1 cell line

Supervisor: Dr. Göran I. V. Klobučar, Prof.

Co-supervisor: dipl. ing. Maja Šrut, Assist.

Reviewers: Dr. Göran I. V. Klobučar, Prof.

Dr. Zdravko Dolenec, Prof.

Dr. Mirjana Pavlica, Prof.

Thesis accepted: 15th of September 2010.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Ekotoksikologija morskog okoliša	1
1.2. Biomonitoring	2
1.3. Ekogenotoksikologija	3
1.4. Komet test	4
1.4.1. Komet test na ribljim stani nim linijama.....	6
1.4.1.1. Stani na linija ribljih hepatocita PLHC-1	7
1.5. Cilj istraživanja	8
 2. MATERIJALI I METODE	 9
2.1. Lokacije uzorkovanja	9
2.1.1. Kostrena	11
2.1.2. ACI Opatija.....	11
2.1.3. Terminal za rasuti teret Luka Rijeka – lokalitet Bakar.....	12
2.1.4. Brodogradilište 3. Maj	12
2.1.5. Luka Rijeka.....	13
2.1.6. Ina Rafinerija nafte Rijeka – lokalitet Mlaka.....	13
2.2. Uzorkovanje morskog sedimenta	14
2.3. Ekstrakcija spojeva iz sedimenta	14
2.3.1. Ekstrakcija spojeva iz sedimenta razli itim otapalima	14
2.4. Priprema PLHC-1 stani ne kulture i tretiranje stanica	14
2.5. Komet test	15
2.5.1. Mikroskopska analiza preparata	16
2.5.2. Statisti ka obrada podataka	17

3. REZULTATI	18
3.1. Komet test na PLHC-1 stanicama nakon izlaganja ekstraktima sedimenta	18
3.1.1. Indukcijski faktor ekstrakata sedimenta	22
3.1.2. Indukcijski faktor ovisan o koncentraciji ekstrakata sedimenta	24
3.2. Komet test na PLHC-1 stanicama nakon izlaganja uzorcima sedimenta s postaje Rafinerija Ina ekstrahiranih različitih otapalima.....	25
3.2.1. Indukcijski faktor uzoraka sedimenta s postaje Rafinerija Ina ekstrahiranih različitih otapalima	27
3.2.1. Indukcijski faktor ovisan o koncentraciji uzoraka sedimenta s postaje Rafinerija Ina ekstrahiranih različitih otapalima.....	29
4. RASPRAVA	30
5. ZAKLJUČAK.....	35
6. LITERATURA	36

1. UVOD

1.1. Ekotoksikologija morskog okoliša

Određene tvari koje dospiju u okoliš prirodnim ili antropogenim putem predstavljaju opasnost zbog potencijalnog uzrokovanja štetnih pojava, koje, u manjoj ili većoj mjeri, mogu poremetiti stabilnost ekosustava i dovesti do smanjenja biološke raznolikosti. Svaku takvu kvalitativnu i kvantitativnu promjenu fizičkih, kemijskih i bioloških karakteristika glavnih komponenti okoliša (voda, zrak, tlo i dr.) smatramo njegovim onečišćenjem. Znanost koja se bavi istraživanjem toksičnih i drugih onečišćivača na ekosustav i njegove sastavnice nazivamo ekotoksikologija.

Onečišćivači u okolišu kruže kroz atmosferu, organsku tvar (organizmi, tlo, sediment, različite faze) i hidrosferu, a u tom procesu kruženja može doći do njihovih fizikalnih i kemijskih promjena, razrjeđivanja u okolišu ili odlaganja. Iako je onečišćenje voda globalni problem, mnoge zemlje i dalje stvaraju veliko opterećenje onečišćivača, a otkriva se da se taj trend i povećati (Shahidul Islam i Tanaka 2004). Onečišćivači u vodu ulaze neposredno putem otpadnih voda, kanalizacije, odlaganja otpada, izljeva nafte, ali i posredno, ispiranjem tla te prašinom i padalinama iz zraka. Obalna područja su pod posebnim pritiskom od onečišćenja jer na njih neposredno utječu aktivnosti i s mora i s kopna, te su krajnji recipijenti mnogih otpadnih produkata raznih društveno-gospodarskih aktivnosti (industrijska proizvodnja, poljoprivreda, turizam, urbanizacija). Iako većinom obnovljivi, obalni resursi često su izloženi prevelikom iskorištavanju. Zbog toga obalna područja zahtijevaju odgovarajuću brigu i zaštitu, kako bi se negativni antropogeni utjecaji sveli na najmanju moguću mjeru.

Sediment prekriva najveći dio morskog dna. Mnoge kemijske tvari i njihove smjese, zbog velike upotrebe i u nekim slučajevima postojane prirode, degradiraju zdravlje ekosustava akumulirajući se u sedimentima (McCauley i sur. 2000). Postoje i značajni onečišćivači okoliša su pol ciklički aromatski ugljikovodici (eng. *polycyclic aromatic hydrocarbons* - PAHs), poliklorirani bifenili (eng. *polychlorinated biphenyls* - PCBs), dioksini, određeni pesticidi, herbicidi i fungicidi. Upravo se ti postojani organski onečišćivači (eng. *persistent organic pollutants* - POPs) u vodenom okolišu zbog hidrofobnih svojstava

vežu na suspendirane estice s kojima se onda talože u sedimentu. Posljedica toga je sediment s 1000 ili više puta veom koncentracijom PAH-ova nego pripadaju i mu vodeni stupac (Notar i sur. 2001; Bihari i sur. 2007). Osim POPs-a, i teški metali su važna grupa one iš iva a voda koja se tako er adsorpcijom veže na suspendirane estice te se na taj na in nakupljaju u sedimentu. Sediment optere en takvim one iš iva ima predstavlja potencijalnu opasnost za pridružene mu organizme, ali i za sve ostale do kojih može do i putem hranidbenog lanca. Budu i da djeluje i kao recipijent i kao sekundarni izvor one iš enja, sediment ima posebnu važnost u ekotoksikološkim istraživanjima morskog okoliša.

1.2. Biomonitoring

Podatke o mogućem negativnom utjecaju one iš enja na organizme dobivamo putem razli itih analiza uzoraka iz okoliša. Kemijske analize mjere koncentraciju kemijskih tvari u zraku, tlu, vodi i živim organizmima, a otkrivaju vrstu one iš enja u okolišu. Me utim, same kemijske analize esto nisu dovoljne za precizan opis uzoraka iz okoliša, zbog neizvedivosti prepoznavanja i mjerenja koncentracije svih mogućih toksikanata (Davoren i sur. 2005). Od mnogih one iš iva a prona enih u razli itim uzorcima sedimenta, tek se ograni en dio može otkriti i kvantificirati putem rutinskih kemijskih analiza (Kammann i sur. 2000). Osim toga, toksi nost kemijskih tvari koje dopiju u okoliš, osim o njihovoj koncentraciji, ovisi i o razli itim fizikalno-kemijskim karakteristikama medija u kojem se nalaze (temperatura, pH vrijednost, itd.), kao i o njihovoj biološkoj dostupnosti organizmima. Tako er, veliki broj razli itih kemikalija u okolišu može me usobno stupati u razne interakcije, a njihov rezultat može biti adicija, antagonizam ili sinergizam. Tako i sudbina i ponašanje organskih one iš iva a u sedimentu ovisi o razli itim imbenicima, uklju uju i karakteristike sedimenta, svojstva one iš iva a i okolišne imbenike kao što su temperatura i taloženje (Reid i sur. 2000). Iz tih je razloga u svrhu procjene utjecaja one iš enja na okoliš, osim kemijskih analiza, potrebno koristiti i biološke analize koje mjere reakcije organizama na one iš enje.

Jedan od na ina biološke analize razli itih komponenti okoliša je provo enje laboratorijskih testova toksi nosti - biotestova. To su standardizirani ekotoksikološki testovi u kojima se prati djelovanje uzoraka vode, sedimenta, tla ili odre ene kemikalije na organizme/stanice iste vrste u strogo kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Biotestovi

omogu uju procjenu koli ine biološki aktivnih tvari u uzorcima iz okoliša prema razini njihova u inka na testne organizme (Chapman i Long 1983), i mogu pomo i u procjeni potencijalne toksi nosti složenih smjesa one iš iva a prisutnih u okolišu (Kammann i sur. 2000).

S ciljem pravovremenog otkrivanja negativnih promjena u okolišu nastalih one iš enjem i odre ivanja stupnja izloženosti organizama one iš enju, potrebno je provoditi biološki nadzor okoliša, tj. biomonitoring. Biomonitoring podrazumijeva pra enje stanja bioloških sustava, izme u ostalog, i pomo u biomarkera, tj. pokazatelja promjena na molekularnoj odnosno stani noj i fiziološkoj razini organizma, koji u homeostazi imaju normalne vrijednosti, a s nastupanjem stresa te se vrijednosti mijenjaju. Bilo koju analizu koja ukazuje na interakciju izme u biološkog sustava i potencijalno šetnog kemijskog, fizikalnog ili biološkog djelovanja nazivamo biomarkerom (WHO 1993). Važnost biomarkera odražava se u injenici da daju odgovor na biološki raspoložive koncentracije one iš iva a, a promjene uzrokovane one iš enjem mogu se opaziti relativno rano.

1.3. Ekogenotoksikologija

Potencijalno šetno djelovanje one iš iva a može se procijeniti na razli itim razinama biološke organizacije: od molekule, stanice, tkiva, organa i organizma, pa do populacije, zajednice i ekosistema. Odgovor na molekularnoj razini prethodi odgovorima na višim organizacijskim razinama, pa je stoga najraniji pokazatelj i upozorenje na promjene u okolišu. Jedno od naju estalijih mjesta djelovanja one iš enja na molekularnoj razini je molekula DNA. Utjecaj genotoksi nih kemikalija na cjelovitost DNA jedan je od prvih doga aja u organizmima izloženima one iš iva ima (Frenzilli i sur. 2009). Biomonitoringom DNA ošte enja u prirodi bavi se ekogenotoksikologija. To je znanost o kemijski ili zra enjem izazvanim promjenama genetskog materijala organizama u prirodi (Anderson i sur. 1994).

Nakon ošte enja DNA, stanica ima tri mogu nosti: potpuni popravak ošte enja DNA, nepotpuni popravak ošte enja DNA ili samouništenje (apoptoza). U slu aju nepotpunog popravka dolazi do mutacija i nastanka disfunkcionalnih proteina, teratogeneze (razvojne malformacije), karcinogeneze (rak ili neoplazija) ili klastogeneze (kromosomske aberacije). O tome govori i Kurelec (1993), te navodi niz promjena koje slijede nakon ošte enja molekule

DNA, kao što su poremećena funkcija enzima i proteina, promjene u metabolizmu, inhibicija rasta i razvoja, degenerativni procesi i atrofija tkiva i organa, ubrzano starenje, poremećeni imunološki odgovor, smanjena reprodukcija, povećana učestalost bolesti, smanjene prilagodbe i preživljavanje, te na kraju nestanak vrste. Sve te poremećaje zajedno naziva sindromom genotoksičnih bolesti. Budući da prethodi navedenim događajima, oštećenje DNA je izvrstan pokazatelj štetnog djelovanja na okoliš jer otvara mogućnost preventivnog djelovanja s ciljem zaštite i očuvanja viših razina biološke organizacije, npr. očuvanja populacija ili vrsta, te općenito bolje kvalitete okoliša.

Kemikalije mogu oštetiti DNA izravnim djelovanjem (bez metaboličke aktivacije), putem metabolita, stvaranjem reaktivnih vrsta kisika (eng. *reactive oxygen species* - ROS), inhibicijom sinteze i popravka DNA, te putem drugih složenih mehanizama (Lee i Steinert 2003). Do oštećenja DNA dolazi i u normalnim uvjetima, npr. prilikom replikacije i tijekom uobičajenih stanica njihovih procesa kao što su metabolizam i respiracija, no izlaganje kemijskim spojevima i zračenju može znatno povećati količinu tih oštećenja, a time i njihove posljedice.

Međudjelovanje genotoksičnih spojeva s molekulom DNA prvo uzrokuje njene strukturalne promjene koje obuhvaćaju stvaranje lomova lanaca DNA, promjenu baza, stvaranje DNA adukata (kovalentno vezanje kemijskog spoja ili njegovih metabolita za baze i fosfatne skupine u DNA), te unakrsne veze DNA (Shugart i Theodorakis 1994; Devaux i sur. 1997; Kosmehl i sur. 2004). Budući da je stvaranje lomova lanaca DNA povezano s mutagenim i karcinogenim svojstvima okolišnih onečišćivača različitih struktura (Frenzilli i sur. 2009), oni se koriste kao biomarkeri genotoksičnosti u biomonitoringu vodenih ekosustava (Mitchellmore i Chipman 1998).

1.4. Komet test

Jedna od metoda utvrđivanja genotoksičnog djelovanja kojom se analiziraju primarna oštećenja molekule DNA je komet test. Komet test ili gel elektroforeza pojedinačnih stanica (eng. *single cell gel electrophoresis assay* - SCGE) je jednostavna metoda mjerenja lomova lanaca DNA u eukariotskim stanicama (Collins 2004). Tijekom mikrogel elektroforeze jezgara, fragmenti DNA, ukoliko su prisutni lomovi, migriraju iz jezgre prema anodi. Jezgra s

repom nalikuje kometu i postaje vidljiva nakon fluorescentnog bojanja DNA, a postotak DNA u repu upu je na stupanj genotoksičnosti.

Prvo izravno mjerenje količine oštećene DNA u pojedinačnim stanicama izveli su 1978. godine Rydberg i Johanson. Stanice uklopljene u agarozni gel lizirali su u blago lužnatim uvjetima, čime su postigli djelomičnu denaturaciju DNA. Nakon bojanja akridin oranžom detektirali su dvostrane (zeleno) i jednolane lomove (crveno). 1984. godine Östling i Johanson su u metodu uveli elektroforezu, koju su proveli u neutralnim uvjetima. Tijekom elektroforeze, fragmenti DNA putovali su prema anodi brže od ostatka jezgre. Prema veličini tih fragmenata određena je količina oštećene DNA, ali zbog neutralnih uvjeta omogućena je detekcija samo dvostranih lomova (Cotelle i Ferard 1999; Rojas i sur. 1999).

Postupak komet testa, koji se s manjim izmjenama i prilagodbama koristi i danas, uveli su 1988. godine Singh i sur. Prema tom se protokolu elektroforeza odvija u izrazito lužnatim uvjetima ($\text{pH} > 13$) koji osiguravaju prekidanje vodikovih veza i odvajanje lanaca molekule DNA. Na taj je način omogućeno, osim dvostranih, detektiranje i jednolanih lomova. Osim DNA lomova koji su uzrokovani genotoksičnim tvarima izravno ili putem reaktivnih međuspojeva (Lee i Steinert 2003), komet test otkriva i mjesta osjetljiva na lužnate uvjete te mjesta nepotpunog popravka oštećenja izrezivanjem, od kojih se oboje ispoljavaju kao jednolani lomovi (Tice i sur. 2000). Upravo su jednolani DNA lomovi najčešća primarna oštećenja DNA i vrlo osjetljiv biomarker genotoksičnosti (Kammann i sur. 2001). Također, ovom je metodom moguće detektirati i unakrsne veze DNA-DNA i DNA-protein, koje, za razliku od lomova, smanjuju DNA migraciju u usporedbi s kontrolom (Hartmann i sur. 2003). Iako komet test otkriva lezije koje su nastale nedavno i mogu se popraviti (Frenzilli i sur. 2009), prevelik genotoksični pritisak može rezultirati nasljednim promjenama DNA s negativnim posljedicama koje se mogu pokazati tek u narednim generacijama (Schnurstein i Braunbeck 2001).

Komet test je vrlo osjetljiva, brza i ekonomična metoda detekcije oštećenja DNA primjenjiva na bilo koji eukariotski tip stanica (Fairbairn i sur. 1995; Mitchelmore i Chipman 1998; Tice i sur. 2000; Lee i Steinert 2003; Frenzilli i sur. 2009). Osim toga, ova metoda otkriva oštećenja u pojedinačnim stanicama te zahtijeva mali broj stanica koje ne moraju biti

mitoti ki aktivne (Cotelle i Ferard 1999; Rojas i sur. 1999; Kammann i sur. 2001; Lee i Steinert 2003; Frenzilli i sur. 2009). Jedini zahtjev je da dovoljan broj pojedina nih stanica bude održan u suspenziji bez uzrokovanja dodatnih ošte enja (Rojas i sur. 1999).

Metoda komet testa svoju je primjenu pronašla u razli itim područjima istraživanja, od testiranja genotoksi nosti novih kemikalija, biomonitoringa ljudi i okoliša, do istraživanja ošte enja i popravaka DNA te razli ite upotrebe u genetici i toksikologiji (Tice i sur. 2000; Collins 2004). Budu i da se pokazao kao pogodna metoda za istraživanje genotoksi nog potencijala uzoraka iz okoliša (Cotelle i Ferard 1999), komet test je korišten i u ovom radu.

1.4.1. Komet test na ribljim stani nim linijama

Do podataka o toksi nom u inkulturi na molekularnoj i stani noj razini može se u inkovito do i uz pomo stani nih kultura (Bols i sur. 2005). Stani ne kulture, osobito one dobivene iz riba, uspješno se primjenjuju u ekotoksikološkim istraživanjima kao alternativa istraživanjima na živim organizmima (Davoren i sur. 2005). U usporedbi s *in vivo* istraživanjima, stani ne kulture zahtijevaju manju količinu uzoraka, provedba testa je brža i jeftinija, osjetljiviji su i specifičiji, a interpretacija rezultata je jasnija jer nema nekih dodatnih imbenika koji bi mogli utjecati na njih, kao što su bioakumulacija i pro išavanje (Bols i sur. 2005; Davoren i sur. 2005). Osim toga, upotrebom stani nih kultura smanjuje se korištenje i žrtvovanje životinja. Za proučavanje animalnih stanica *in vitro* koriste se dva tipa stani nih kultura: primarne kulture i stani ne linije. Primarne se kulture dobivaju izravno iz tkiva životinje i uobičajeno traju samo nekoliko dana, dok stani ne linije nastaju nakon prvog supkultiviranja primarne kulture i imaju puno duži životni vijek (Bols i sur. 2005).

Stani ne su linije, osim navedenih prednosti koje imaju sve stani ne kulture, standardizirane, lako dostupne i upotrebljive, njihova priprema i održavanje zahtijeva manje laboratorijskog rada te pružaju neograničene zalihe genetski homogenih stanica (Nehls i Segner 2005; Bols i sur. 2005; Zhou i sur. 2006). Visoki potencijal u ekotoksikologiji pokazale su riblje stani ne linije (Fent 2001). U istraživanjima se koriste radi određivanja relativne toksi nosti razli itih spojeva i uzoraka iz okoliša, kod proučavanja interakcija između ekotoksikanata i fizikalnih parametara okoliša, te prilikom razvoja biomarkera (Bols i sur. 2005). Kod procjene uzoraka iz okoliša, riblje stani ne linije koriste se u razli itim

biotestovima radi otkrivanja prisutnosti toksa tih tvari u uzorcima riba, vode i sedimenta. Ti biotestovi uključuju procjenu citotoksičnosti, određivanje aktivnosti arilhidrokarbonskog (eng. *aryl hydrocarbon* - Ah) receptora mjerenjem CYP1A (eng. *cytochrome P450 1A*) indukcije, procjenu genotoksičnosti, te određivanje okolišnih estrogena i spojeva koji uzrokuju oksidativni stres (Bols i sur. 2005).

Komet test je uspješno izveden sa nekoliko ribljih stanica i linija, uključujući i RTG-2 (Nehls i Segner 2001), RTL-W1 (Nehls i Segner 2001; Rocha i sur. 2009), RTH-149 (Avishai i sur. 2002; Kamer i Rinkevich 2002) i EPC stanice i linije (Kammann i sur. 2001; Kammann i sur. 2004). Komet test na stanici i liniji EPC pokazao je jasne razlike u genotoksičnosti ekstrakata morskog sedimenta s različitim lokacijama u Sjevernom i Baltičkom moru, a rezultati su povezani s ukupnom količinom organske tvari u sedimentu i s analiziranim onečišćivačima (Kammann i sur. 2001; Kammann i sur. 2004). Kamer i Rinkevich (2002) su upotrebu komet testa na ribljim hepatocitima stanici i liniji RTH-149 ocijenili kao brzu i osjetljivu metodu prikladnu za otkrivanje genotoksičnog potencijala u programima monitoringa vodenog okoliša. Rezultati Nehlsa i Segnera (2005) također upućuju na prikladnost komet testa sa stanici i linijom RTG-2 kao *in vitro* metode istraživanja genotoksičnog potencijala uzoraka iz okoliša.

1.4.1.1. Stanice i linija ribljih hepatocita PLHC-1

Stanice i linija PLHC-1, dobivena iz karcinoma ribljih hepatocita vrste *Poeciliopsis lucida*, do sada je korištena u različitim istraživanjima toksikologije vodenog okoliša. PLHC-1 stanice zadržavaju mnoga svojstva potpuno diferenciranih hepatocita te imaju relativno kratko vrijeme duplikacije (24 h). PLHC-1 stanice imaju kapacitet metaboliziranja ksenobiotika, što omogućuje, osim izravnih, otkrivanje i neizravnih toksikanata (Babich i sur. 1991). PLHC-1 stanice i linija korištena je u istraživanjima citotoksičnosti (Babich i sur. 1991; Fent i Hunn 1996), lipidne peroksidacije (Rau i sur. 2004) i indukcije metalotioneina (Schlenk i Rice 1998). Fent i Hunn (1996) utvrdili su sličan trend kod istraživanja citotoksičnosti *in vitro* na PLHC-1 stanici i liniji i akutne toksičnosti kod riba *in vivo*. Prema Pichardo i sur. (2005), nakon izlaganja toksinima cijanobakterija, PLHC-1 stanice su na morfološkoj i biokemijskoj razini pokazale veću osjetljivost nego RTG-2 stanice. PLHC-1 stanice imaju Ah-receptor, zbog čega se uspješno koriste za određivanje CYP1A indukcije

različitih spojeva i okolišnih uzoraka (Hahn i sur. 1993; Fent 2001). U nekoliko je istraživanja mjerenje CYP1A indukcije u PLHC-1 stanicama korišteno za procjenu toksičnosti sedimenata (Huuskonen i sur. 1998a, 1998b, 2000; Traven i sur. 2008). S obzirom na navedeno, PLHC-1 stanična linija je vrlo pogodan i osjetljiv biološki materijal za provedbu *in vitro* biotestova u svrhu biomonitoringa.

1.5. Cilj istraživanja

Svrha ovog diplomskog rada je uspostava i standardizacija metode komet testa na PLHC-1 ribljoj staničnoj liniji te procjena genotoksičnog potencijala one išenih područja unutar rijeke Kogakvatorija. Sediment uzorkovan na šest postaja različitog intenziteta one išenja u Rijeke kom zaljevu izložen je utjecaju urbanizacije, turizma i različitih industrijskih aktivnosti.

Specifični ciljevi ovog rada bili su:

- uspostaviti i standardizirati metodu komet testa na PLHC-1 ribljoj staničnoj liniji;
- procijeniti genotoksičnost u inak sedimenta iz Rijeke kom zaljeva primjenom komet testa na PLHC-1 stanicama;
- usporediti toksičnost ekstrakata dobivenih upotrebom različitih otapala (metanol, diklormetan, cikloheksan, diklormetan-metanol) s ciljem određivanja skupine toksikanata odgovornih za genotoksičnost u inak;
- usporediti i povezati rezultate dosadašnjih istraživanja u Rijeke kom zaljevu s rezultatima komet testa, te ustanoviti njegovu upotrebljivost u biomonitoringu morskog okoliša.

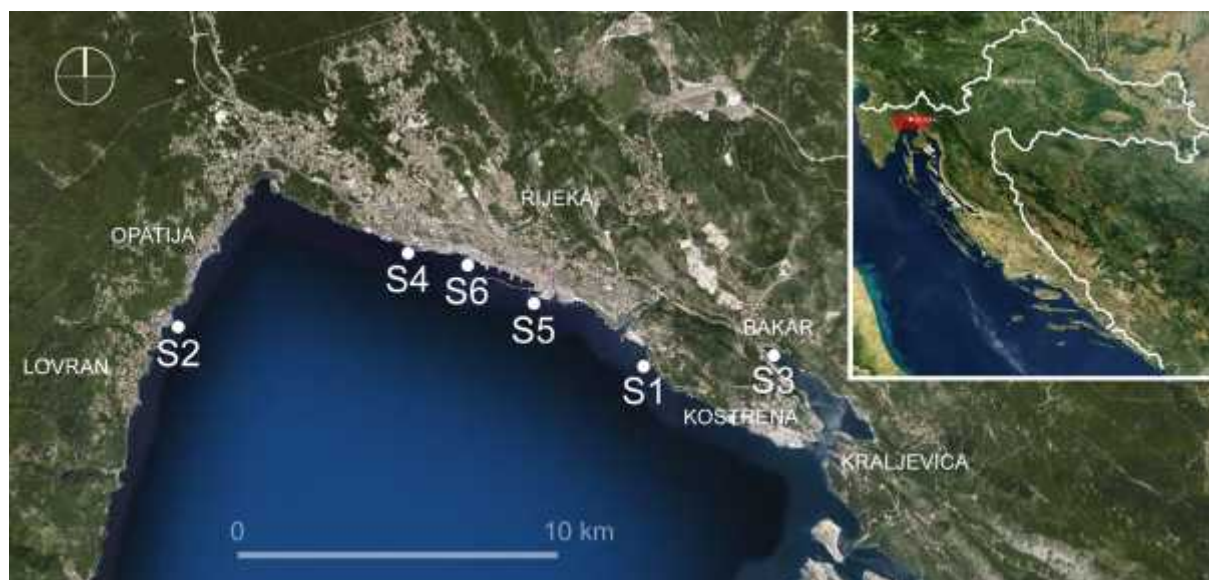
2. MATERIJALI I METODE

2.1. Lokacije uzorkovanja

Rije ki zaljev je najsjeverniji dio Kvarnerskog zaljeva u Jadranskom moru, smješten izme u zapadne obale Krka, Istarskog poluotoka i sjevernog dijela Hrvatskog primorja. Uzorci sedimenta sakupljeni su u Rije kom zaljevu na šest lokacija razli itog stupnja i vrste one iš enja (tablica 1., slika 1.).

Tablica 1. Lokacije uzorkovanja sedimenta u Rije kom zaljevu.

Lokacije uzorkovanja sedimenta	Geografska širina i dužina
Kostrena (S1)	N 45° 18,104'; E 14° 29,394'
ACI Opatija (S2)	N 45° 18,825'; E 14° 17,269'
Terminal za rasuti teret Luka Rijeka – lokalitet Bakar (S3)	N 45° 18,286'; E 14° 32,705'
Brodogradilište 3. Maj (S4)	N 45° 20,236'; E 14° 23,320'
Luka Rijeka (S5)	N 45° 19,502'; E 14° 26,512'
Ina Rafinerija nafte Rijeka – lokalitet Mlaka (S6)	N 45° 20,052'; E 14° 24,860'



Slika 1. Kartografski prikaz lokacija uzorkovanja sedimenta u Rije kom zaljevu: Kostrena (S1), ACI Opatija (S2), Terminal Bakar (S3), Brodgradilište 3. Maj (S4), Luka Rijeka (S5), Rafinerija Ina (S6).

Godišnje opterećenje Rije kog zaljeva industrijskim otpadnim vodama iznosi 560 milijuna m³, od kojih se 182 milijuna m³ ispušta bez prethodne obrade, dok gradske otpadne vode ispuštaju 23 milijuna m³ (Cvitković, 2005).

Traven i sur. (2008) analizirali su koncentracije primarnih onečišivača u sedimentu uzorkovanom na istim lokacijama kao u ovom radu (tablica 2.). Prema ukupnoj količini PAH-ova, četiri uzorka sedimenta (Terminal Bakar, Brodogradilište 3. Maj, Luka Rijeka, Rafinerija Ina) okarakterizirani su kao jako onečišteni. Kod postaja Brodogradilište 3. Maj i Luka Rijeka izmjerene su povišene koncentracije PCB-a koje mogu uzrokovati neke štetne učinke. S obzirom na analizirane koncentracije teških metala (Pb, Cd, Hg, Cu, Zn), većine onečišćenje pokazale su postaje Terminal Bakar, Brodogradilište 3. Maj, Luka Rijeka i Rafinerija Ina.

Tablica 2. CYP1A indukcija izražena kao EC50 vrijednost EROD aktivnosti (pokazuje enzimsku aktivnost CYP1A proteina), ukupna koncentracija PAH-ova, PCB-a i teških metala u uzorcima sedimenta iz Rije kog zaljeva (Traven i sur. 2008).

	Kostrena	ACI Opatija	Terminal Bakar	Brodo- gradilište 3. Maj	Luka Rijeka	Rafinerija Ina
EROD (EC50)	nije det.	1.8	0.24	0.4	0.56	0.082
Ukupni PAH-ovi (µg/kg s.t.)	113.82	204.63	1523.82	7145.17	9403.63	11478.65
PCB-i (ng/kg s.t.)				48	67	
Teški metali (mg/kg s.t.):						
Pb	6.08	19.33	35.96	916	97.92	3304
Cd	0.072	0.308	0.59	0.531	0.250	6.221
Hg	0.038	0.176	0.095	24.33	2.118	1.649
Cu	12.2	32.6	45.9	1755	89.5	169
Zn	32.8	101	354	6479	196	2852

2.1.1. Kostrena (S1)

Kostrena je smještena u blizini grada Rijeke, okružena uvalom Martinšica i Bakarskim zaljevom. Cijelom dužinom kostrenske obale smještene su plaže, a osim kupališnih, u Kostreni postoje i različiti ugostiteljsko-turistički sadržaji.

Višegodišnjim je ispitivanjima uzoraka morske vode u sezoni kupanja na četiri lokacije duž obalnog područja Kostrene prema Pravilniku o kontroli kvalitete morske vode za kupanje i rekreaciju (NN 48/1986) ustanovljeno da sanitarna kvaliteta obalnog mora zadovoljava tražene kriterije mora pogodnog za kupanje i rekreaciju. U studiji Preliminarna ispitivanja utjecaja brodogradilišta "Viktor Lenac" u Martinšici na okoliš (Zavod za zaštitu zdravlja Rijeka, prosinac 1992) postaja u uvali Svežanj izabrana je kao referentna postaja prilikom istraživanja pridnenih zajednica uvale Martinšica. Ustanovljeno je da su u uvali Svežanj zajednice morskog dna prema sastavu i distribuciji karakteristične za nezagađene vode i ne pokazuju degradabilne promjene (Općina Kostrena Online 2010).

Sediment je uzorkovan ispred ronilakog centra, na dubini od 39 m.

2.1.2. ACI Opatija (S2)

ACI marina Opatija nalazi se u mjestu Ičići, na sjeverozapadnoj obali Rijeke zagljava. Marina raspolaže s 302 veza u moru te s 35 mjesta za smještaj plovila na kopnu. Svi vezovi su opremljeni priključcima za vodu i struju. Osim toga, u marini se nalazi recepcija, mjenjačnica, restoran, kafić, sanitarni prostor (WC i tuševi), pralionica rublja, prodavaonica prehrambenih namirnica, prodavaonica nautičke opreme i odjeće, servisna radionica, dizalica nosivosti 15 t, navoz i parkiralište za osobna vozila (ACI 2010).

Marina je 1999. godine, zadovoljivši potrebna ekološka mjerila u pogledu sigurnosti i čistoće vode i okoliša, dobila priznanje "Europska plava zastava". U 2000. godini je nominirana za isto priznanje (ACI 2010).

Sediment je uzorkovan unutar marine, na dubini od 5 m.

2.1.3. Terminal za rasuti teret Luka Rijeka – lokalitet Bakar (S3)

Terminal za rasute i sipke terete rijeke luke nalazi se u Bakarskom bazenu, jednom od pet riječnih bazena. Bakar je smješten 15 km jugoistočno od grada Rijeke.

Terminal u Bakru služi za prekrcaj i skladištenje željezne rude, ugljena i ostalih rasutih tereta. 2008. godine moderniziran je suvremenom opremom za prekrcaj (brodoiskrciva, brodokrciva, skladišni most i transportna traka), koja omogućuje kontinuirani ukrcaj i iskrcaj, time je smanjena emisija prašine. Terminal raspolaže operativnom obalom s dubinom mora od 18,5 m, što omogućuje prihvat brodova do 150 000 DWT. Kapacitet jednokratnog skladištenja željezne rude je 400 000 t, a ugljena 130 000 t. Maksimalni godišnji kapacitet terminala iznosi 3 500 000 t rude (Luka uprava Rijeka 2010).

Sediment je uzorkovan neposredno ispred terminala za rasuti teret, na dubini od 30 m.

2.1.4. Brodogradilište 3. Maj (S4)

Brodogradilište 3. Maj nalazi se nedaleko od grada Rijeke i po veličini je drugo brodogradilište u Hrvatskoj.

Proizvodnja brodova u 3. Maju uključuje brodove svih tipova do 260 m duljine i 50 m širine, tankere do 110 000 t nosivosti, kontejnerske brodove kapaciteta do 4 000 TEU jedinica i brodove za rasute terete/ruda do 130 000 t nosivosti. Uz proizvodnju brodova koja je osnovna djelatnost, u brodogradilištu se proizvode brodske palubne dizalice, brodska oprema, spremnici za plinovite/tekuće industrijske medije, oprema za naftu, petrokemijsku i kemijsku industriju, čelična konstrukcija i drugi građevinski materijali, odljevci i otkivci (Made in Croatia 2010).

Sediment je uzorkovan u zoni gradnje, na dubini od 15 m.

2.1.5. Luka Rijeka (S5)

Luka Rijeka smještena je na sjeveroistočnoj obali Rije kog zaljeva. Povoljan geoprometni položaj, dubina mora u Rije kod zaljevu i dobro zaštićena obala Rijeku čine najvećom lukom na Jadranu.

Luka kod područja je prostire se na pet bazena: Rijeka, Sušak, Bakar, Raša, Omišalj i skladišni kompleks Škrlevo. Sediment je sakupljen na području terminala za generalni teret koji se nalazi u Rije kod bazenu. Terminal raspolaže s 11 vezova i operativnom obalom s dubinom mora do 12 m koja omogućuje prihvata brodova do 30 000 DWT. Osim pretovara i skladištenja klasičnog generalnog tereta, terminal služi i za pretovar papira, drva, metalurških proizvoda, opasnih tereta, teških tereta te smrznute i kondicionirane hrane. Maksimalni godišnji kapacitet terminala je oko 2 000 000 tona (Luka uprava Rijeka 2010).

Sediment je uzorkovan na dubini od 20 m.

2.1.6. Ina Rafinerija nafte Rijeka – lokalitet Mlaka (S6)

Rafinerija nafte Rijeka započela je s radom 1883. godine u prigradskom području Mlaka. 1965. godine otvorena su nova postrojenja na lokaciji Urinjskoj, kojima rafinerija dobiva preradbeni kapacitet od 8 milijuna tona. Pogon na Mlaci se tada specijalizira za proizvodnju maziva, a pogon na Urinjskoj za goriva (INA 2010).

Pogon na Mlaci proizvodi motorna ulja te turbinska i kompresorska ulja. S ciljem ukidanja štetnih emisija u okoliš, tijekom listopada 2008. obustavljena je proizvodnja baznih ulja, bitumena, loživa ulja i parafina. Otpadne vode pogona na Mlaci ispuštaju se kroz tri ispusta: ispust API separatora (pročišćena mješovita voda), ispust uređaja Krofta (pročišćena procesna voda) i ispust rashladnih voda (neonizirana, toplinski opterećena, rashladna voda). Sva tri ispusta izlijevaju se u morski okoliš na istom mjestu (INA 2010).

Sediment je uzorkovan neposredno ispred ispusta na dubini od 30 m.

2.2. Uzorkovanje morskog sedimenta

Uzorkovanje sedimenta obavljeno je autonomnim ronila kim aparatom (ARA), ime je omogu ena vizualna provjera podru ja uzorkovanja i uzimanje reprezentativnog uzorka. Kanticom od polistirena uzorkovan je površinski dio (prvih 10 cm) sedimenta. Uzorci su zatim ostavljeni u polietilenskim vre icama na -20 °C do daljnje obrade.

2.3. Ekstrakcija spojeva iz sedimenta

Uzorkovani sediment je sušen u sušioniku (Memmert GmbH, Schwabach, Njema ka) na 40°C u mraku, a nakon toga prosijan kroz sito promjera 500 µm radi uklanjanja ne isto a. Sediment (2 g) je zatim ekstrahiran u ultrazvu noj kupelji (Sonorex Longlife, Bandelin Electronics, Njema ka) tijekom 30 min na sobnoj temperaturi u otopini diklormetan-metanol (15 ml) (v:v – 2:1) (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Kao otapalo za ekstrakciju je upotrijebljen diklormetan-metanol kako bi se iz uzorka ekstrahirala što šira (nespecifi nija) serija organskih one iš iva a. Ekstrakt je nakon toga profiltriran kroz filter sa staklenim vlaknima (φ 125 mm; Macherey-Nagel, Njema ka) te uparen do suha na rotacijskom upariva u (Heidolph, Laborota 4000, Schwabach, Njema ka). Suhi ostatak je otopljen u dimetilsulfoksidu (DMSO) (1 mL) (Kemika, Zagreb, Hrvatska) te pohranjen u mraku na 4°C. Od tako pripremljenih uzoraka sedimenta napravljene su odgovaraju e serije razrje enja.

2.3.1. Ekstrakcija spojeva iz sedimenta razli itim otapalima

Sediment uzorkovan na postaji Ina Rafinerija nafte Rijeka – lokalitet Mlaka je dodatno ekstrahiran s još tri otapala koja se razlikuju prema stupnju polarnosti. Ta otapala su metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska) (polarno otapalo), diklormetan (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i cikloheksan (Merck, Darmstadt, Njema ka) (nepolarna otapala). Ostatak postupka ekstrakcije je ostao neizmijenjen.

2.4. Priprema PLHC-1 stani ne kulture i tretiranje stanica

PLHC-1 stanice (ATCC CRL-2406) su uzgajane u flaskovima za kulturu stanica površine 25 cm² u DMEM/F12 mediju (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, USA) s 5% fetalnog

gove eg seruma (eng. *foetal bovine serum* - FBS) (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, USA) na 30°C. Stanice su presa ivane svakih 3-5 dana u omjeru 1:3.

Za procjenu genotoksi nosti, stanice su nacjepljivane na mikroplo u s 24 jamice u 1 mL medija tijekom 24 h kako bi se sve stanice pri vrstile na podlogu. Nakon 24 h, medij je uklonjen i zamijenjen serijskim razrje enjima ekstrahiranih uzoraka sedimenta (0.08-20 mg/mL). Maksimalni udio DMSO-a u mediju je bio 1%. Napravljene su po tri replike za svaku ispitivanu koncentraciju po postaji, kao i za svaku ispitivanu koncentraciju po otapalu za postaju Rafinerija Ina. Netretirane stanice poslužile su kao kontrola, a dodatne replike su izložene mediju s 1% DMSO-a kako bi se isklju io njegov u inak na ošte enje DNA. Stanice su zatim inkubirane 24 h na 30°C. Nakon inkubacije stanice su isprane s 1 mL fosfatnog pufera (eng. *phosphate buffer saline* - PBS), tripsinizirane hladnom otopinom 0.4%-tnog tripsina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) u PBS-u te podvrgnute komet testu. Vijabilnost stanica je procijenjena metodom bojenja tripanskim modrilom, te je za sve testirane koncentracije iznosila preko 95%.

2.5. Komet test

Komet test je s manjim izmjenama izveden prema protokolu kojeg su opisali Singh i sur. (1988). Na djelomi no brušena predmetna stakalca nanesen je prvi sloj agaroznog gela, 1% NMP (eng. *normal melting point*) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) agaroz. Kada se agarozni gel posušio, 50 µl suspenzije stanica je pomiješano s 50 µl 0.5% LMP (eng. *low melting point*) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) agaroze i stavljeno na predmetna stakalca koja su zatim prekrivena pokrovnicom. Gel je nakon 3 min na 0 °C o vrsnuo, a pokrovnice su uklonjene. Tada je nanesen tre i sloj agaroznog gela, 80 µl 0.5% LMP agaroze, stakalca su zatim prekrivena pokrovnicom i ostavljena 3 min na 0 °C da gel o vrsne. Pokrovnice su zatim uklonjene, a predmetna stakalca su uronjena u prethodno prire enu otopinu za liziranje stanica (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH 10) tijekom 1 h na 4 °C u mraku. Nakon toga, preparati su isprani destiliranom vodom, odloženi u kadicu za elektroforezu i prekriveni prethodno prire enim hladnim puferom za alkalnu denaturaciju DNA (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH>13). Nakon 20 min, u istom je puferu provedena elektroforeza na 25 V (0.83 V/cm) i 300 mA kroz 20 min pri 4°C. Poslije elektroforeze preparati su isprani hladnim neutralizacijskim puferom (0.4 M

Tris-HCl, pH 7.5), 2x5 min. Preparati su zatim fiksirani otopinom metanol:octena kiselina (3:1) tijekom 5 min i pohranjeni u mraku na sobnoj temperaturi.

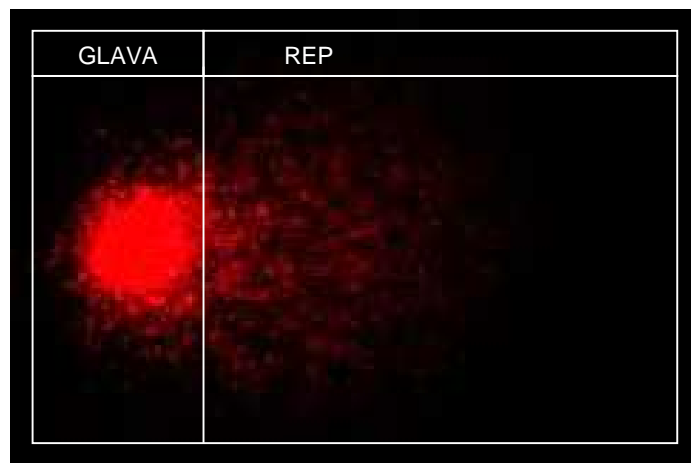
2.5.1. Mikroskopska analiza preparata

Prije pregledavanja preparata mikroskopom, stanice su rehidrirane destiliranom vodom i tretirane otopinom fluorescentne boje etidij bromid (10 $\mu\text{g/mL}$) (EtBr, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Suvišak boje je ispran destiliranom vodom, a preparati su prekriveni pokrovnica i pregledani Zeiss Axioplan epifluorescencijskim mikroskopom (filter 09: ekscitacija na valnoj duljini 520 nm, emisija na valnoj duljini 610 nm) pri pove anju objektiva 40x. Mikroskop je povezan s CCD kamerom. Po svakom preparatu je pregledano i fotografirano najmanje 50 nasumi no odabranih stanica (slika 2.).



Slika 2. Fluorescencijsko mikroskopska slika PLHC-1 stanica nakon izvedenog komet testa.

Stanice su zatim analizirane u računalnom programu za analizu slika Komet 5.0 (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Kao parametar za procjenu oštećenja DNA korišten je postotak DNA koja je tijekom elektroforeze migrirala u rep (% tDNA) (slika 3.).



Slika 3. Glava i rep kometa.

2.5.2. Statisti ka obrada podataka

Za svaku je grupu izra unata srednja vrijednost DNA ošte enja na temelju srednjih vrijednosti svake od replika unutar grupe. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i pripadaju a standardna pogreška ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Za statisti ku analizu je korišten Mann-Whitney *U*-test. Statisti ki zna ajni podaci odre eni su sa $p < 0,05$.

Razlika u % tDNA izme u negativne kontrole i tretiranih grupa prikazana je kao induksijski faktor (eng. *induction factor* - IF), koji je dobiven dijeljenjem srednje vrijednosti % tDNA svake koncentracije po postaji odnosno otapalu sa srednjom vrijednosti % tDNA negativne kontrole. Tako er je izra unat i induksijski faktor ovisan o koncentraciji (eng. *concentration dependent induction factor* - CDI) kojeg su razvili Seitz i sur. (2008). CDI je jednostavan indeks koji objedinjuje sve koncentracije i odgovaraju e induksijske faktore, pružaju i osnovu za op u usporedbu genotoksi nog potencijala u komet testu. CDI se ra una prema slijede oj jednadžbi:

$$CDI = \sum_{i=1}^n \frac{IF_i}{c_i} ,$$

gdje je IF_i = induksijski faktor koncentracije i ; c_i = koncentracija i ; n = broj koncentracija. Zbog usporedbe rezultata dobivenih u ovom radu sa rezultatima drugih autora, CDI je izra unat za etiri koncentracije izme u 2,5 i 20 mg/mL.

3. REZULTATI

Oštećenje DNA u PLHC-1 stanicama mjereno komet testom prikazano je kao postotak DNA koja je tijekom elektroforeze migrirala u rep (% tDNA). Dobivena vrijednost negativne kontrole iznosi 2,60% tDNA, a negativne kontrole s DMSO-om 2,91% tDNA (tablica 3.).

Tablica 3. % tDNA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) dobiven komet testom na netretiranim PLHC-1 stanicama i PLHC-1 stanicama uzgajanim u mediju s 1% DMSO-a.

	% tDNA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)			
	1. grupa replika	2. grupa replika	3. grupa replika	\bar{x}
kontrola	1,77 \pm 0,08	3,24 \pm 0,16	2,78 \pm 0,15	2,60 \pm 0,08
kontrola + DMSO	1,92 \pm 0,11	3,16 \pm 0,13	3,64 \pm 0,22	2,91 \pm 0,10

3.1. Komet test na PLHC-1 stanicama nakon izlaganja ekstraktima sedimenta

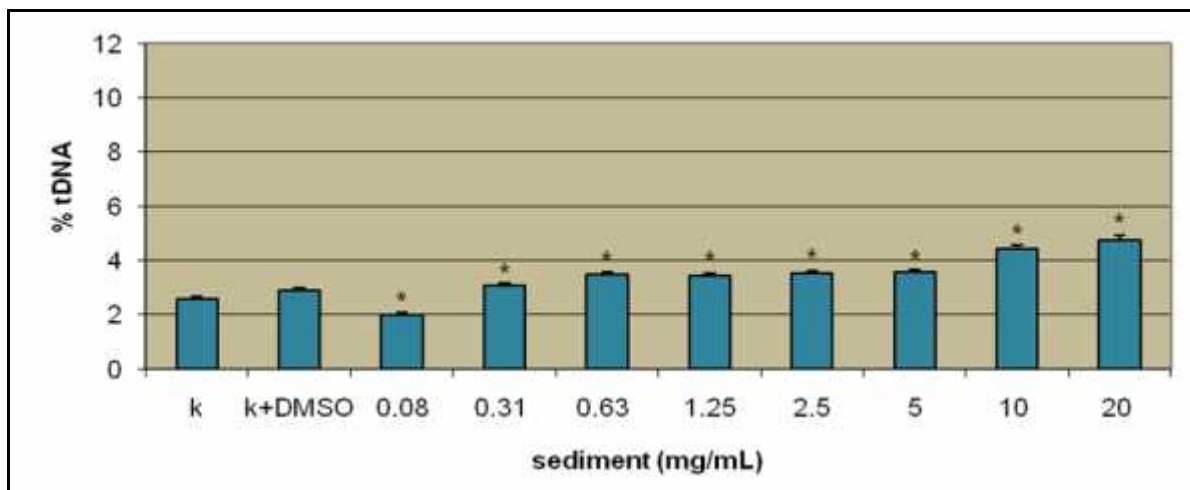
Ekstrakti sedimenta sa svih ispitivanih postaja pokazali su genotoksičnost u inak ovisan o koncentraciji. Sve su koncentracije kod svih ispitivanih postaja pokazale statistički značajnu promjenu % tDNA u odnosu na negativnu kontrolu.

Prema tablici 4., najmanje oštećenje DNA pokazale su stanice tretirane ekstraktom sedimenta s postaje Kostrena (slika 4.), s vrijednostima tDNA između 1,99% kod najmanje ispitivane koncentracije (0,08 mg/mL) i 4,47% kod najveće ispitivane koncentracije (20 mg/mL). Uzorci sedimenta s postaja ACI Opatija (slika 5.) i Brodogradilište 3. Maj (slika 6.) pokazali su nešto veće oštećenje DNA u odnosu na postaju Kostrena, s vrijednostima tDNA između 3,37%, odnosno 1,67% kod najmanje i 5,36%, odnosno 5,47% kod najveće koncentracije sedimenta. Stanice izložene ekstraktu sedimenta s postaje Luka Rijeka (slika 7.) najmanje su oštećene, koje iznosi 3,14% tDNA, pokazale kod najmanje koncentracije, dok je najveće oštećenje, 8,31% tDNA, postignuto kod koncentracije sedimenta od 10 mg/mL. Na postaji Terminal Bakar (slika 8.) oštećenje DNA je između 3,05% tDNA kod najmanje i 9,35% tDNA kod najveće koncentracije sedimenta. Najveće oštećenje DNA je pokazala postaja Rafinerija Ina (slika 9.), kod koje je najmanje oštećenje od 4,46% tDNA dobiveno kod

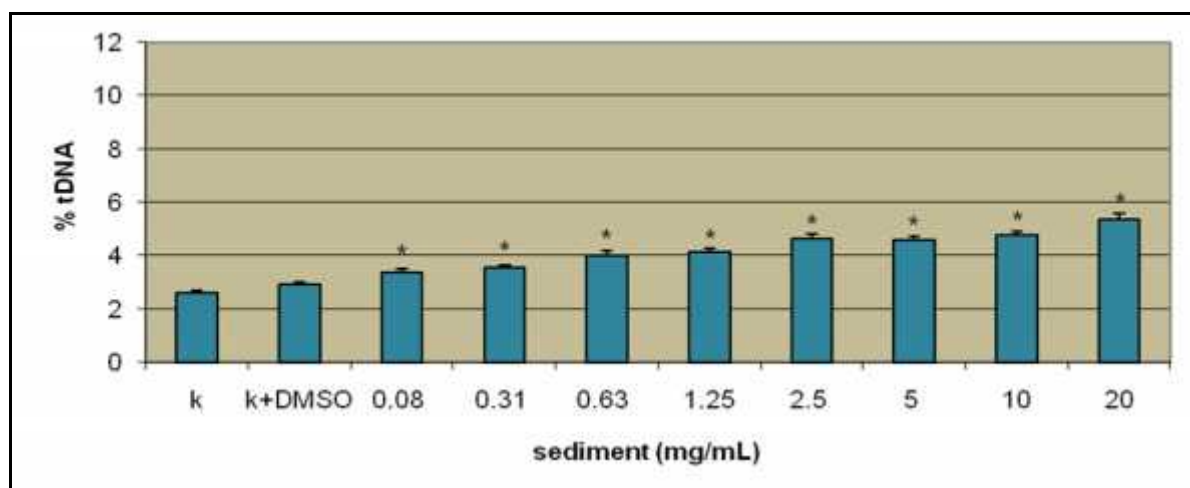
najmanje koncentracije, a najveće oštećenje od 9,53% tDNA kod koncentracije od 1,25 mg/mL.

Tablica 4. % tDNA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) u PLHC-1 stanicama po postajama u Rije kom zaljevu dobiven komet testom nakon izlaganja različitim koncentracijama ekstrakata sedimenta.

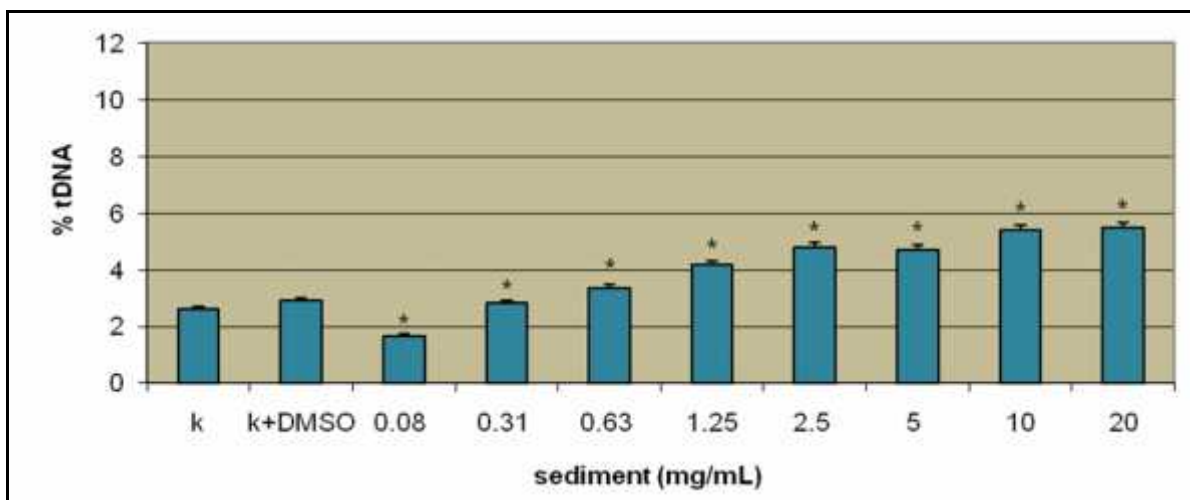
konc. ekstrakta sedimenata u mediju(mg/mL)	% tDNA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)					
	Kostrena	ACI Opatija	Terminal Bakar	Brodogradilište 3. Maj	Luka Rijeka	Rafinerija Ina
0,08	1,99 ± 0,09	3,37 ± 0,13	3,05 ± 0,15	1,67 ± 0,09	3,14 ± 0,14	4,46 ± 0,28
0,31	3,09 ± 0,10	3,56 ± 0,09	4,51 ± 0,13	2,83 ± 0,10	3,66 ± 0,11	5,11 ± 0,28
0,63	3,47 ± 0,11	4,01 ± 0,18	5,05 ± 0,15	3,34 ± 0,13	5,30 ± 0,18	6,57 ± 0,34
1,25	3,44 ± 0,10	4,15 ± 0,11	5,26 ± 0,17	4,18 ± 0,12	4,27 ± 0,11	9,53 ± 0,55
2,5	3,51 ± 0,12	4,61 ± 0,18	5,97 ± 0,21	4,79 ± 0,18	5,82 ± 0,19	7,54 ± 0,52
5	3,56 ± 0,10	4,56 ± 0,14	6,38 ± 0,17	4,72 ± 0,15	7,02 ± 0,16	9,31 ± 0,58
10	4,42 ± 0,13	4,78 ± 0,11	7,53 ± 0,19	5,40 ± 0,16	8,31 ± 0,20	5,50 ± 0,45
20	4,47 ± 0,15	5,36 ± 0,21	9,35 ± 0,24	5,47 ± 0,19	8,22 ± 0,24	9,02 ± 0,42



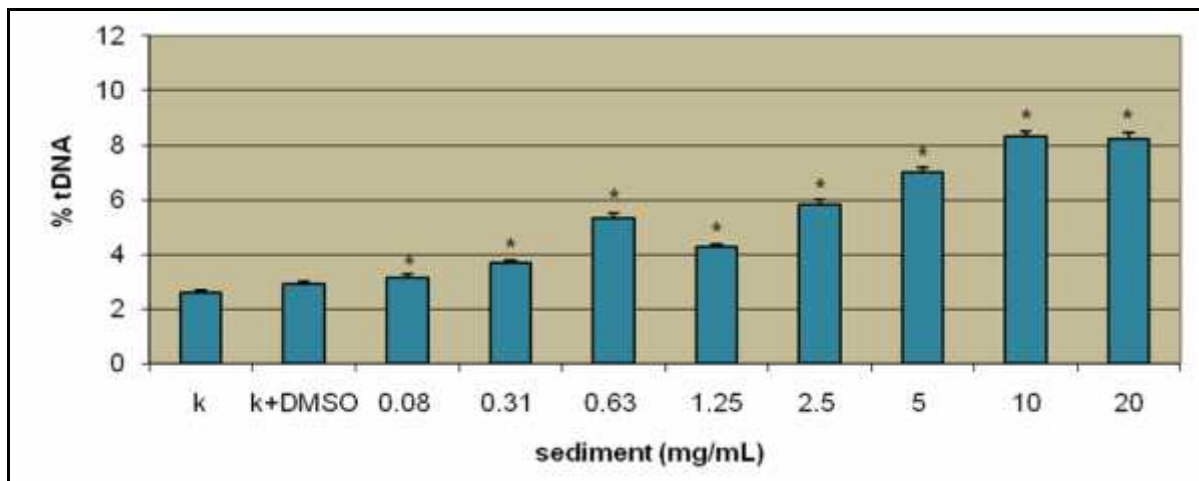
Slika 4. Ošte enje DNA u PLHC-1 stanicama prikazano kao % tDNA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta sedimenta s postaje Kostrena, k - kontrola, p < 0,05 (*).



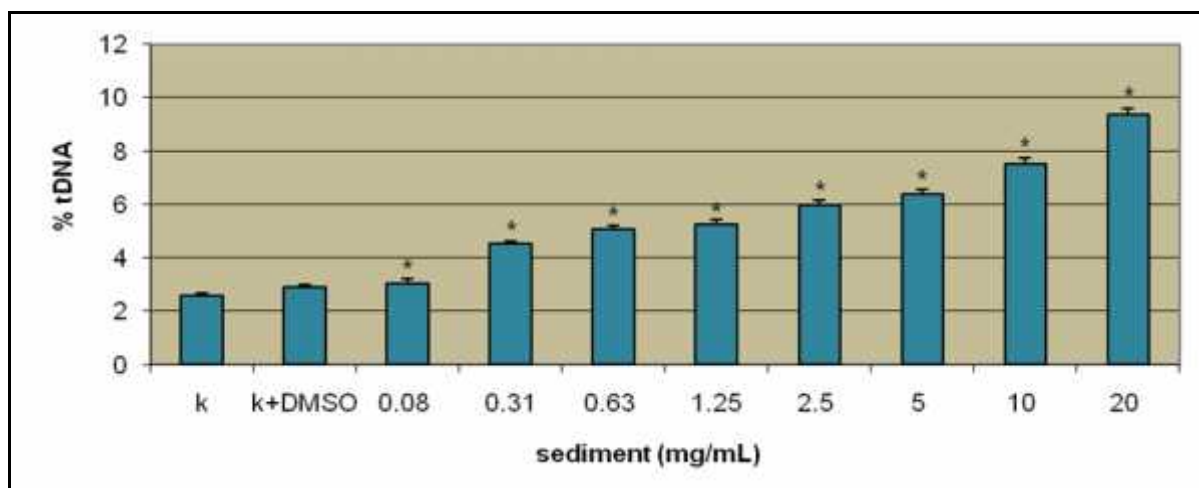
Slika 5. Ošte enje DNA u PLHC-1 stanicama prikazano kao % tDNA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta sedimenta s postaje ACI Opatija, k - kontrola, p < 0,05 (*).



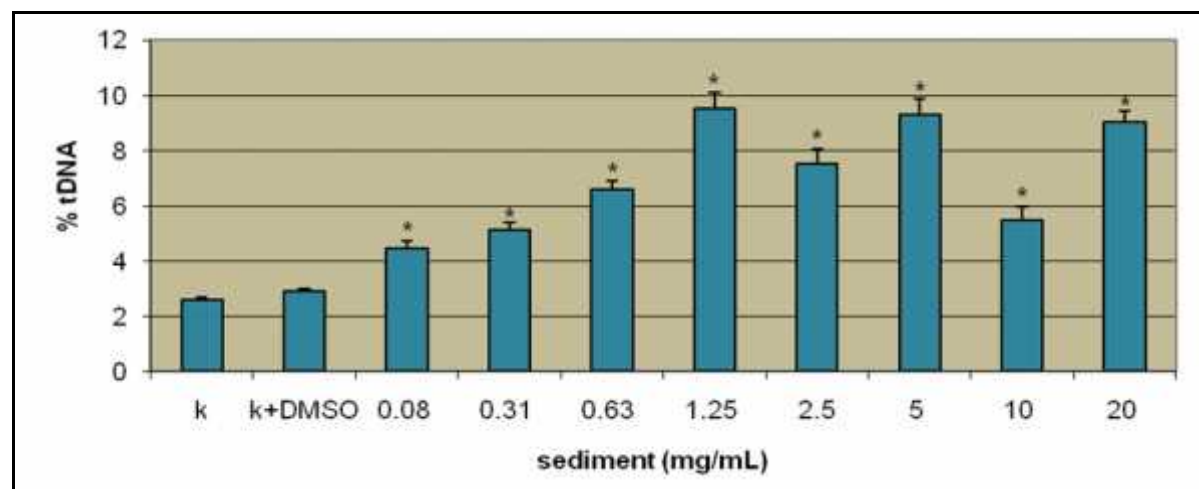
Slika 6. Ošte enje DNA u PLHC-1 stanicama prikazano kao % tDNA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta sedimenta s postaje Brodogradilište 3. Maj, k - kontrola, p < 0,05 (*).



Slika 7. Ošte enje DNA u PLHC-1 stanicama prikazano kao % tDNA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta sedimenta s postaje Luka Rijeka, k - kontrola, p 0,05 (*).



Slika 8. Ošte enje DNA u PLHC-1 stanicama prikazano kao % tDNA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta sedimenta s postaje Terminal Bakar, k - kontrola, p 0,05 (*).



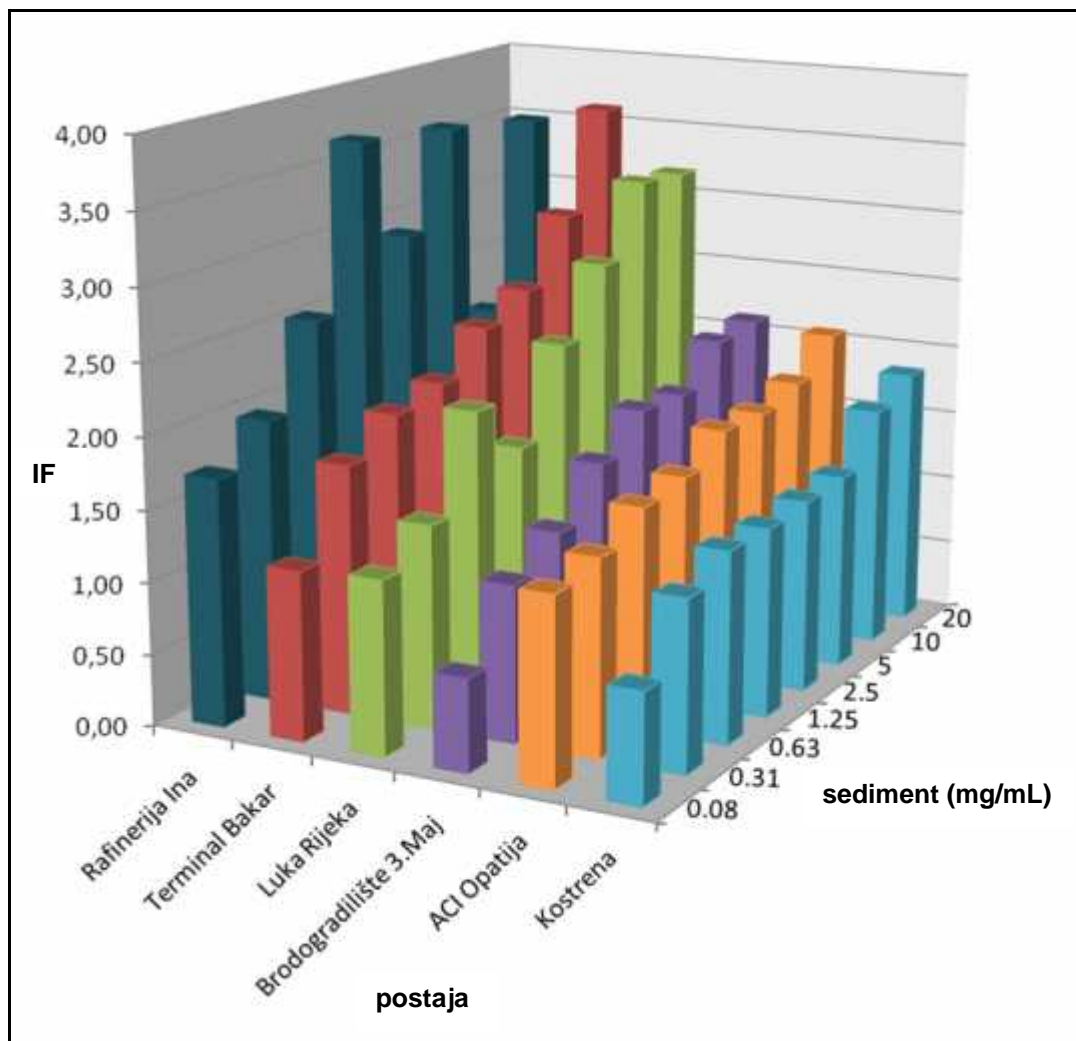
Slika 9. Ošte enje DNA u PLHC-1 stanicama prikazano kao % tDNA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta sedimenta s postaje Rafinerija Ina, k - kontrola, p 0,05 (*).

3.1.1. Indukcijski faktor ekstrakata sedimenta

Prema tablici 5., najmanji genotoksi ni u inak pokazala je postaja Kostrena s najve im IF-om od 1,84 kod najve e analizirane koncentracije (20 mg/mL). Slijede postaje ACI Opatija i Brodogradilište 3. Maj, koje su najve i IF tako er postigle kod najve e koncentracije, a koji iznosi 2,07, odnosno 2,11. Ve i genotoksi ni u inak pokazale su postaje Luka Rijeka, s najve im IF-om od 3,21 kod koncentracije 10 mg/mL, i Terminal Bakar s najve im IF-om od 3,61 kod najve e analizirane koncentracije. Najve i genotoksi ni u inak u odnosu na druge postaje pokazala je postaja Rafinerija Ina, s najve im IF-om od 3,68 kod koncentracije 1,25 mg/mL. Slika 10. pokazuje grafi ki prikaz indukcijskog faktora po postajama.

Tablica 5. Pove anje ošte enja DNA u tretiranim grupama u odnosu na negativnu kontrolu prikazano kao indukcijski faktor (IF).

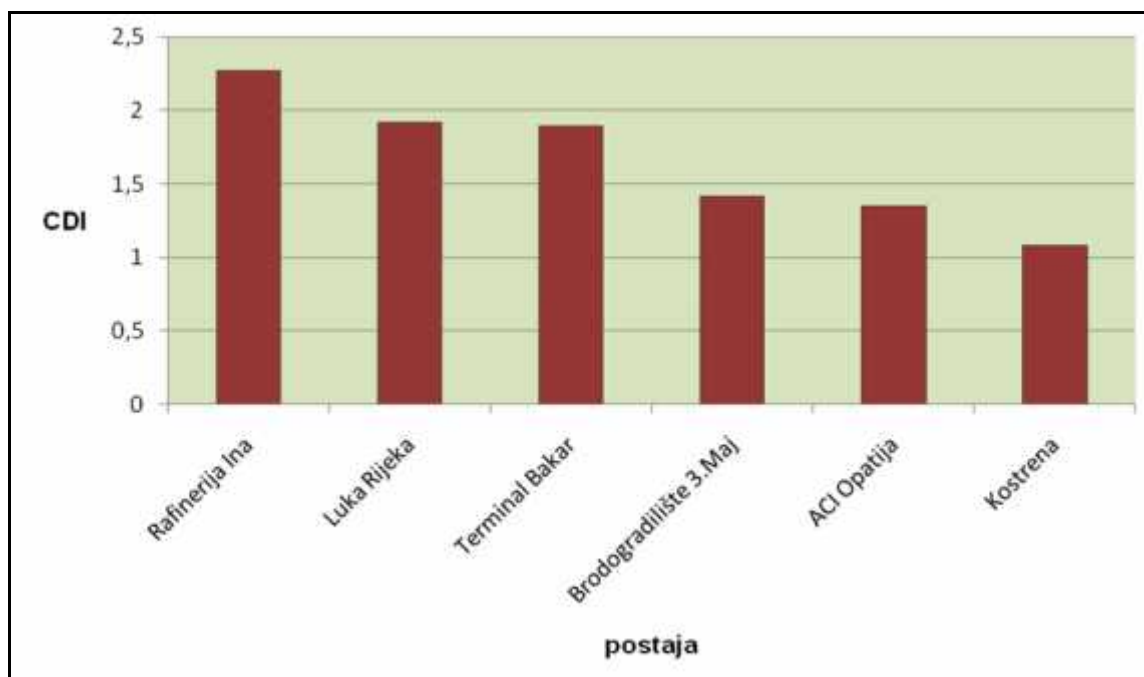
konc. ekstrakta sedimenata u mediju(mg/mL)	IF					
	Kostrena	ACI Opatija	Terminal Bakar	Brodogradilište 3. Maj	Luka Rijeka	Rafinerija Ina
0,08	0,77	1,30	1,18	0,64	1,21	1,72
0,31	1,19	1,37	1,74	1,09	1,41	1,97
0,63	1,34	1,55	1,95	1,29	2,05	2,54
1,25	1,33	1,60	2,03	1,61	1,65	3,68
2,5	1,35	1,78	2,30	1,85	2,25	2,91
5	1,37	1,76	2,46	1,82	2,71	3,59
10	1,71	1,85	2,91	2,09	3,21	2,12
20	1,84	2,07	3,61	2,11	3,18	3,48



Slika 10. Indukcijski faktor (IF) po postajama u Rije kom zaljevu u ovisnosti o koncentraciji ekstrakata sedimenta.

3.1.2. Indukcijski faktor ovisan o koncentraciji ekstrakata sedimenta

Slika 11. prikazuje dobivene CDI-faktore za postaje u Rije kom zaljevu. Dobra povezanost CDI-faktora i IF-a potvrđuje da najveći genotoksični potencijal ima postaja Rafinerija Ina, s CDI-faktorom od 2,27. Postaje Luka Rijeka i Terminal Bakar imaju slične CDI-faktore, koji iznose 1,92, odnosno 1,89. Vrijednost CDI-faktora za postaje Brodogradilište 3. Maj, ACI Opatija i Kostrena redom iznosi 1,42, 1,35 i 1,08.



Slika 11. Indukcijski faktor ovisan o koncentraciji (CDI) po postajama u Rije kom zaljevu.

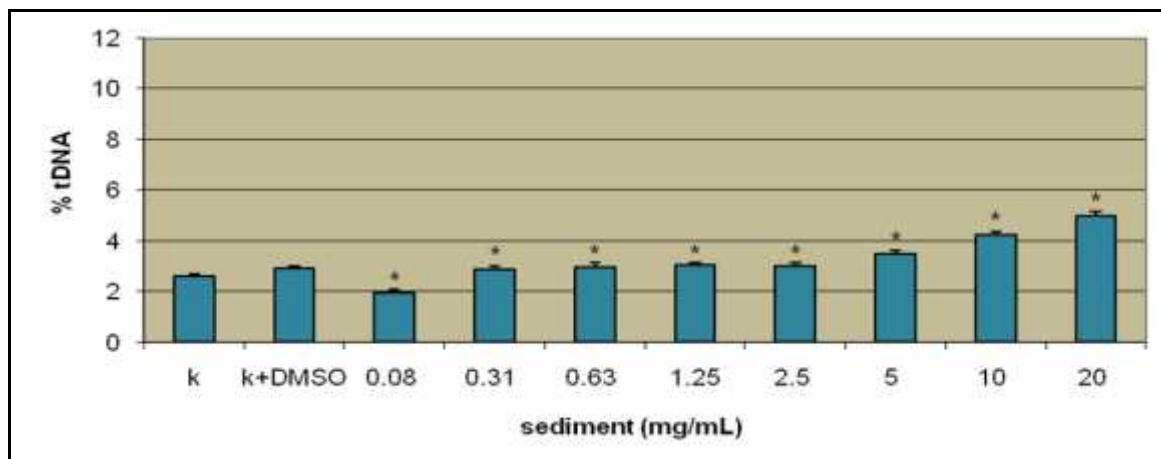
3.2. Komet test na PLHC-1 stanicama nakon izlaganja uzorcima sedimenta s postaje Rafinerija Ina ekstrahiranih razli itim otapalima

Uzorci sedimenta s postaje Ina Rafinerija nafte na Mlaci posebno su ekstrahirani s još tri razli ita otapala. Svi su ekstrakti pokazali genotoksi ni u inak ovisan o koncentraciji. Sve su koncentracije kod svih ekstrakata pokazale statisti ki zna ajnu promjenu % tDNA u odnosu na negativnu kontrolu.

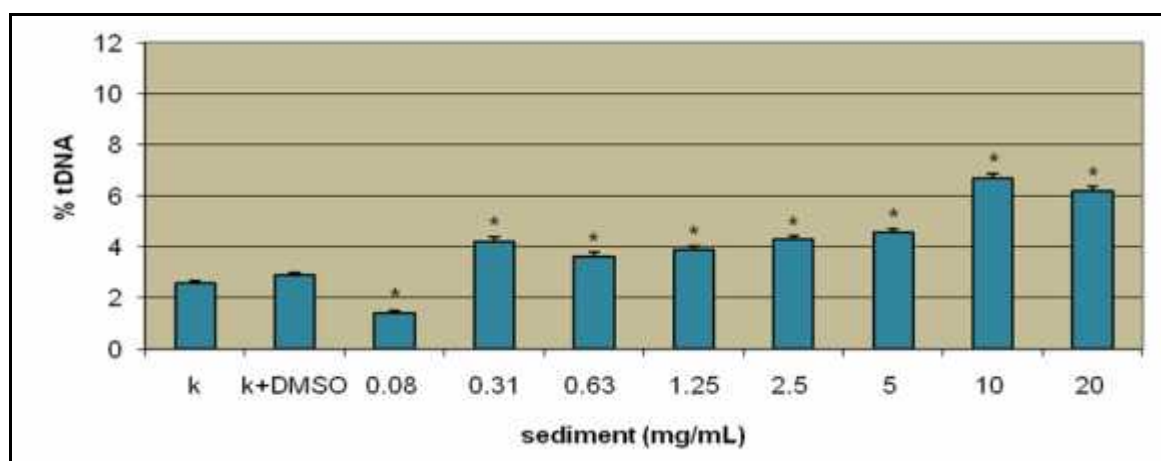
Prema tablici 6., najmanje ošte enje DNA pokazao je ekstrakt s metanolom (slika 11.), s vrijednostima tDNA izme u 1,96% kod najmanje i 5,00% kod najve e koncentracije ekstrakta. U odnosu na njega, ekstrakt s diklormetanom (slika 12.) je pokazao nešto ve e ošte enje DNA kod svih koncentracija, osim kod najmanje, kod koje iznosi 1,43% tDNA, dok je najve e ošte enje uzrokovala koncentracija od 10 mg/mL u vrijednosti od 6,67% tDNA. Ve e ošte enje DNA kod svih koncentracija izazvao je ekstrakt s cikloheksanom (slika 13.), kod kojeg su vrijednosti tDNA izme u 4,24% kod najmanje i 8,75% kod najve e koncentracije ekstrakta. Najve e ošte enje DNA pokazao je ekstrakt s diklormetan-metanolom (slika 14.), koji je korišten i kod ekstrakcije uzoraka sedimenta s ostalih postaja, s vrijednostima tDNA izme u 4,46% kod najmanje i 9,53% kod koncentracije 1,25 mg/mL.

Tablica 6. % tDNA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) u PLHC-1 stanicama po otapalima korištenima u ekstrakciji uzoraka sedimenta s postaje Ina Rafinerija nafte na Mlaci dobiven komet testom.

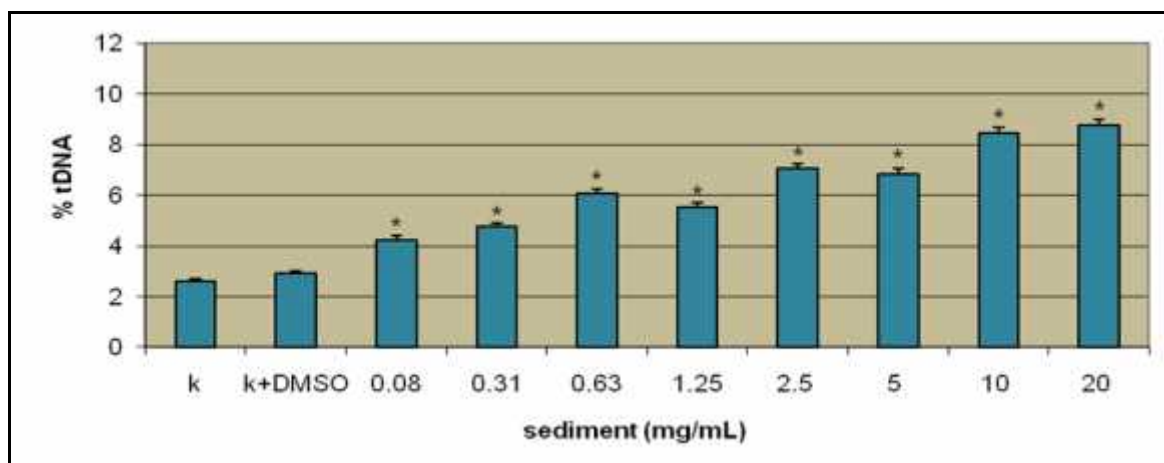
konc. ekstrakta sedimenata u mediju (mg/mL)	% tDNA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)			
	Metanol	Diklormetan	Cikloheksan	Diklormetan- metanol
0,08	1,96 \pm 0,10	1,43 \pm 0,08	4,24 \pm 0,16	4,46 \pm 0,28
0,31	2,89 \pm 0,11	4,20 \pm 0,17	4,76 \pm 0,15	5,11 \pm 0,28
0,63	2,98 \pm 0,14	3,64 \pm 0,15	6,05 \pm 0,19	6,57 \pm 0,34
1,25	3,06 \pm 0,10	3,90 \pm 0,13	5,53 \pm 0,19	9,53 \pm 0,55
2,5	3,00 \pm 0,13	4,30 \pm 0,14	7,07 \pm 0,18	7,54 \pm 0,52
5	3,50 \pm 0,12	4,57 \pm 0,14	6,84 \pm 0,20	9,31 \pm 0,58
10	4,24 \pm 0,13	6,67 \pm 0,20	8,45 \pm 0,22	5,50 \pm 0,45
20	5,00 \pm 0,17	6,17 \pm 0,18	8,75 \pm 0,23	9,02 \pm 0,42



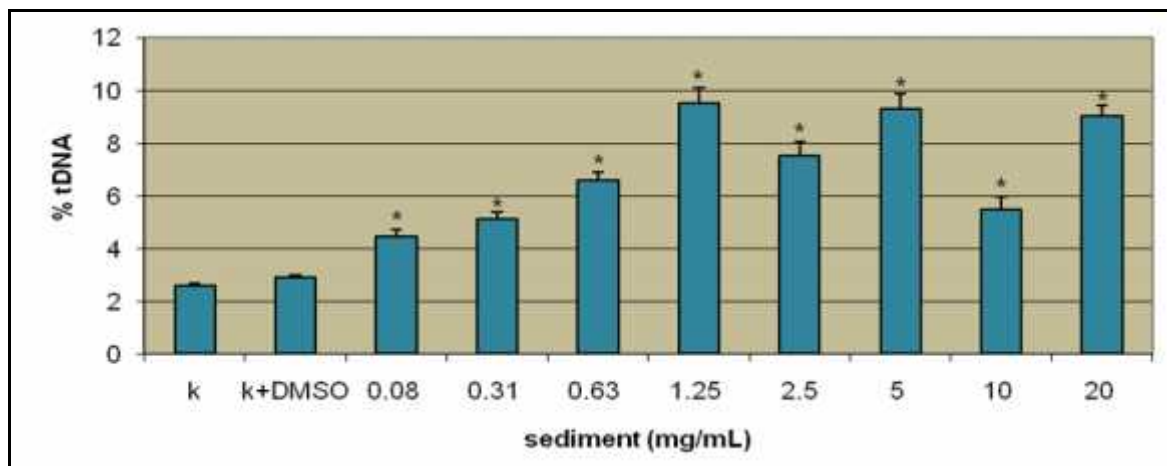
Slika 12. Ošte enje DNA u PLHC-1 stanicama prikazano kao % tDNA ($\bar{x} \pm SD$) u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta sedimenta s postaje Ina Rafinerija nafte na Mlaci ekstrahiranog s metanolom, k - kontrola, p 0,05 (*).



Slika 13. Ošte enje DNA u PLHC-1 stanicama prikazano kao % tDNA ($\bar{x} \pm SD$) u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta sedimenta s postaje Ina Rafinerija nafte na Mlaci ekstrahiranog s diklormetanom, k - kontrola, p 0,05 (*).



Slika 14. Ošte enje DNA u PLHC-1 stanicama prikazano kao % tDNA ($\bar{x} \pm SD$) u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta sedimenta s postaje Ina Rafinerija nafte na Mlaci ekstrahiranog s cikloheksanom, k - kontrola, p 0,05 (*).



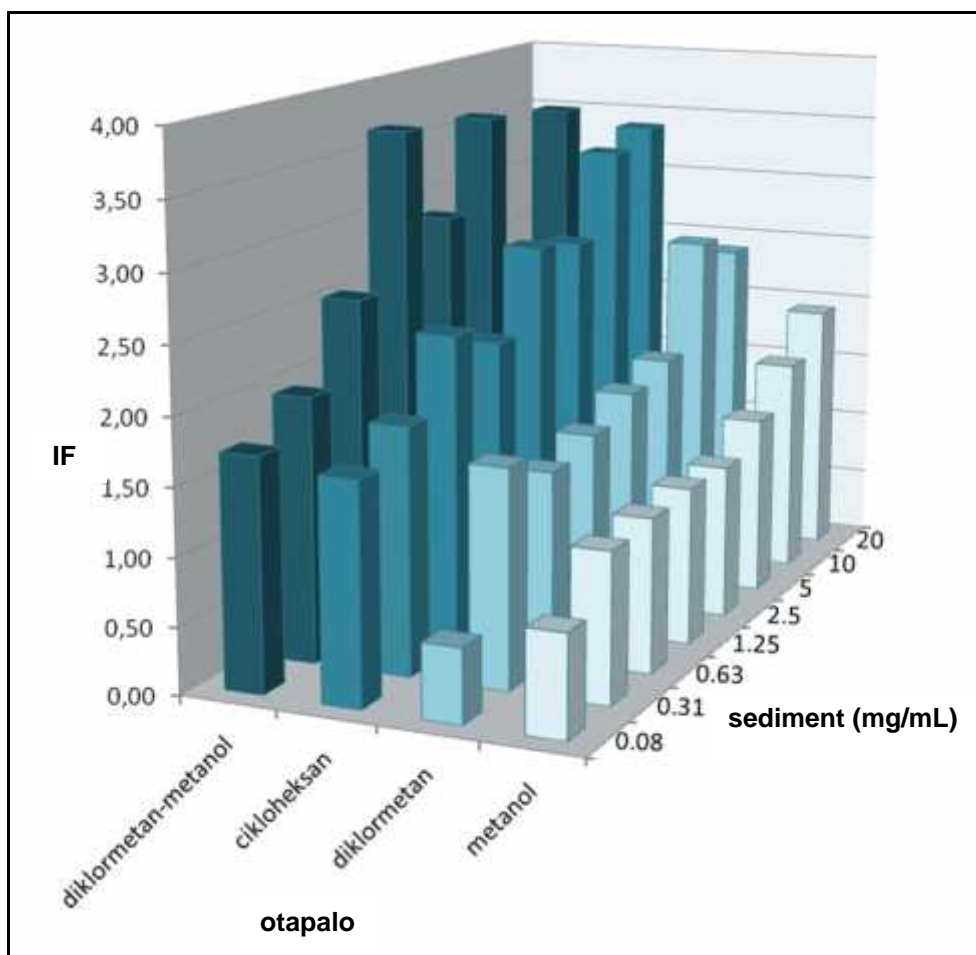
Slika 15. Oštećenje DNA u PLHC-1 stanicama prikazano kao % tDNA ($\bar{x} \pm SD$) u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta sedimenta s postaje Ina Rafinerija nafte na Mlaku ekstrahiranog s diklormetan-metanolom, k - kontrola, p < 0,05 (*).

3.2.1. Indukcijski faktor uzoraka sedimenta s postaje Rafinerija Ina ekstrahiranih različitim otapalima

Prema tablici 7., najmanji genotoksični učinak pokazao je uzorak ekstrahiran s metanolom, s najvećim IF-om od 1,93 kod koncentracije 20 mg/mL. Slijedi uzorak ekstrahiran s diklormetanom, koji je najveći IF od 2,57 postigao kod koncentracije 10 mg/mL, te uzorak ekstrahiran s cikloheksanom, s najvećim IF-om od 3,38 kod koncentracije 20 mg/mL. Najveći genotoksični učinak pokazao je uzorak ekstrahiran s diklormetan-metanolom, kod kojeg najveći IF iznosi 3,68 kod koncentracije 1,25 mg/mL. Slika 15. pokazuje grafički prikaz induksijskog faktora po otapalima za ekstrakciju.

Tablica 7. Povećanje oštećenja DNA u tretiranim grupama u odnosu na negativnu kontrolu prikazano kao induksijski faktor (IF).

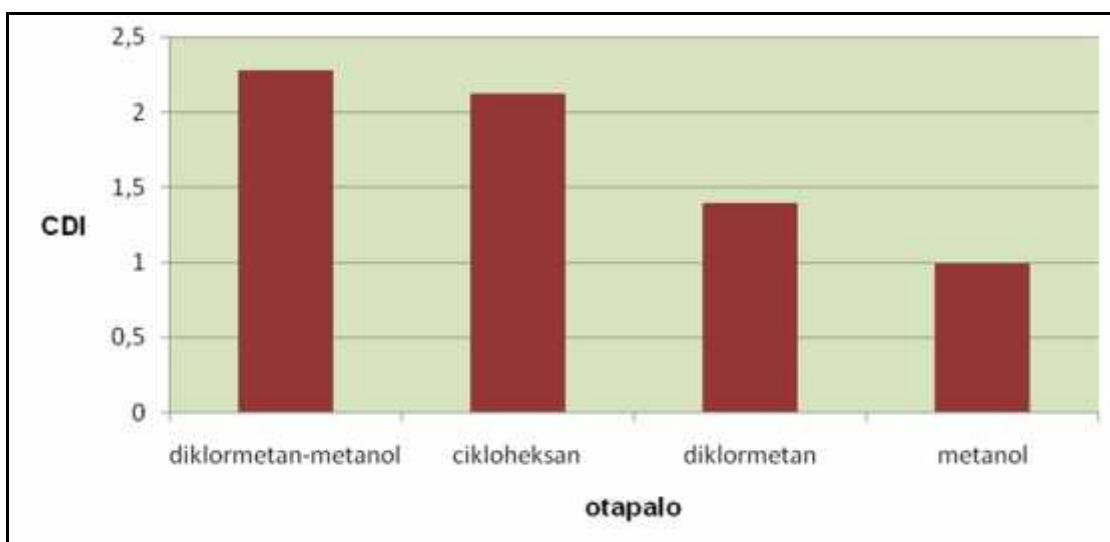
konc. ekstrakta sedimenata u mediju (mg/mL)	IF			
	Metanol	Diklormetan	Cikloheksan	Diklormetan- metanol
0,08	0,76	0,55	1,64	1,72
0,31	1,12	1,62	1,84	1,97
0,63	1,15	1,40	2,33	2,54
1,25	1,18	1,51	2,14	3,68
2,5	1,16	1,66	2,73	2,91
5	1,35	1,76	2,64	3,59
10	1,64	2,57	3,26	2,12
20	1,93	2,38	3,38	3,48



Slika 16. Induksijski faktor (IF) po otapalima za ekstrakciju uzoraka sedimenta s postaje Rafinerija Ina u ovisnosti o koncentraciji.

3.2.2. Indukcijski faktor ovisan o koncentraciji uzoraka sedimenta s postaje Rafinerija Ina ekstrahiranih različitim otapalima

Slika 17. prikazuje dobivene CDI-faktore za otapala korištena u ekstrakciji uzoraka sedimenta s postaje Rafinerija Ina, koji potvrđuju rezultate dobivene IF-om. Najveći CDI-faktor od 2,27 ima uzorak ekstrahiran s diklormetan-metanolom. Slijedi uzorak ekstrahiran s cikloheksanom, s CDI-faktorom od 2,12, zatim uzorak ekstrahiran s diklormetanom, s CDI-faktorom od 1,39, te uzorak ekstrahiran s metanolom, s CDI-faktorom od 0,99.



Slika 17. Indukcijski faktor ovisan o koncentraciji (CDI) po otapalima za ekstrakciju uzoraka sedimenta s postaje Rafinerija Ina.

4. RASPRAVA

One iš enje obalnog mora tvarima antropogenog porijekla predstavlja problem, kako za biljne i životinjske zajednice, tako i za ljude, te stoga zahtijeva odgovaraju u pažnju i djelovanje. Mnoge sinteti ke organske kemikalije (npr. PAH-ovi) koje završavaju u moru predstavljaju opasnost zbog velike toksi nosti i stabilnosti u okolišu i biološkim sustavima, te jake lipofilnosti mnogih od njih, koja zna ajno pove ava njihovu biokoncentraciju/biomagnifikaciju (Shahidul Islam i Tanaka 2004). Briga za zdravlje morskog ekosustava, izme u ostalog, uklju uje i razli ite biomonitoring programe kojima se može pratiti stanje okoliša i, u slu aju nepovoljnih rezultata, pravodobno reagirati. Velik broj one iš iva a, koji mogu biti poznati ili ne, u okolišu ine složene smjese na ije djelovanje na organizme utje e velik broj imbenika. Stoga je pristup analizi nekog okoliša olakšan putem *in vitro* biotestova, koji mogu upotpuniti saznanja dobivena kemijskim analizama i dati brzi uvid u toksi nost okolišnih uzoraka. Mnogi se one iš iva i nakupljaju u morskom sedimentu, koji djeluje kao njihov krajnji recipijent, ali i kao sekundarni izvor one iš enja. Štetno djelovanje tih one iš iva a može se procijeniti na razli itim razinama biološke organizacije, od kojih je u inak na molekularnoj razini jedan od najranijih pokazatelja promjena u okolišu. Tim u incima pripadaju i strukturne promjene molekule DNA koje se mogu detektirati brzom i osjetljivom metodom komet testa.

U ovom je radu upotrebljen komet test u svrhu procjene ošte enja DNA na PLHC-1 stani noj liniji tretiranoj ekstraktima sedimenta sa šest odabranih lokacija u Rije kom zaljevu. Uz to, ekstrakcijom uzoraka s postaje Rafinerija Ina razli itim otapalima procijenjen je genotoksi ni potencijal polarnih i nepolarnih grupa one iš iva a koji se nalaze u analiziranom sedimentu.

Svi su ekstrakti sedimenta pokazali genotoksi ni u inak ovisan o koncentraciji i statisti ki zna ajnu promjenu % tDNA izme u kontrolne i tretiranih grupa. Na temelju rezultata dobivenih komet testom na PLHC-1 stanicama, sediment s postaje Rafinerija Ina pokazao je najve i genotoksi ni u inak, a nakon toga redom slijede postaje Terminal Bakar, Luka Rijeka, Brodogradilište 3. Maj i ACI Opatija, te na kraju postaja Kostrena koja je pokazala najmanji genotoksi ni u inak.

Traven i sur. (2008) analizirali su uzorke sedimenta sakupljene na istim lokacijama kao u ovome radu, te odredili koncentracije primarnih one iš iva a (PAH-ova, PCB-a i teških metala) i proveli biotest CYP1A induksijskog potencijala (biomarker za detekciju nekih one iš iva a - PAH-ova, PCB-a, dioksina). Prema tim rezultatima, svi su uzorci sedimenta potaknuli CYP1A aktivnost u ovisnosti o dozi, te je utvr ena povezanost izme u indukcije CYP1A i koncentracije primarnih one iš iva a u istraživanim uzorcima.

Rezultati komet testa dobiveni u ovom istraživanju u skladu su s rezultatima CYP1A induksijskog potencijala dobivenima u istraživanju Travena i sur. (2008), s izuzetkom postaje Brodogradilište 3. Maj koja je pokazala nešto ve u CYP1A indukciju, a manju genotoksi nost od postaje Luka Rijeka. Sullivan i sur. (2007) su tako er zabilježili zna ajnu povezanost izme u CYP1A induksijskog potencijala i DNA ošte enja mjerenog komet testom, a rezultate su pojasnili mogu om aktivacijom PAH-ova koji su inili ve i dio na enih organskih one iš iva a u ispitivanim uzorcima.

Budu i da su uzorci sedimenta ekstrahirani kombinacijom otapala diklormetan-metanolom, u njima su od analiziranih primarnih one iš iva a mogli biti samo PAH-ovi i PCB-i. Postaja koja je pokazala najmanji genotoksi ni u inak (Kostrena) ima i najmanju koncentraciju PAH-ova u odnosu na druge analizirane postaje, dok je kod postaje s najve im genotoksi nim u inkom (Refinerija Ina) i koncentracija PAH-ova najve a. Op enito, rezultati komet testa se mogu dobro povezati s koncentracijama analiziranih primarnih one iš iva a na pojedinim postajama, premda postoje neka odstupanja. Iako se na temelju koncentracije primarnih one iš iva a postaja ACI Opatija može okarakterizirati kao neone iš ena, a Brodogradilište 3. Maj kao one iš ena postaja, sli na koli ina ošte enja DNA kod ove dvije postaje može zna iti da u sedimentu s postaje ACI Opatija, osim PAH-ova, postoje drugi spojevi s genotoksi nim u inkom. Tako er, budu i da je postaja Terminal Bakar unato relativno nižoj koncentraciji PAH-ova i PCB-a pokazala ve e ošte enje DNA nego postaje Brodogradilište 3. Maj i Luka Rijeka, u sedimentu s postaje Terminal Bakar se vjerojatno nalaze i drugi spojevi koji imaju genotoksi ni u inak.

Razli ita istraživanja sedimenata u Jadranskom moru op enito ukazuju na umjerenu one iš enost PAH-ovima (Notar i sur. 2001; Magi i sur. 2002; Guzzella i De Paolis 2004). Prema istraživanju koje su proveli Bihari i sur. (2007) u Rije kom zaljevu, postoji dobra

povezanost izme u koli ine PAH-ova i toksi nosti organskih ekstrakata sedimenta, iz ega proizlazi da PAH-ovi ine ve inu toksi nih sastojaka prisutnih u organskim ekstraktima sedimenta Rije kog zaljeva. I uzorci sedimenta s etiri od šest postaja koje su predmet ovog rada sadrže zna ajne koli ine PAH-ova, ali ne mogu u potpunosti objasniti uzrok genotoksi nog u inka uzoraka sedimenata dobivenog u ovom radu. Kao i u istraživanju Kammann i sur. (2001), PAH-ovi doprinose genotoksi nosti uzoraka, ali nisu njen jedini uzrok.

Uz veliki broj potencijalnih toksikanata, kao i razli ite parametre koji utje u na njihovo ponašanje u okolišu, vrlo je teško odrediti to an uzrok genotoksi nog djelovanja. Rezultati komet testa u ovome radu idu u prilog tezi Travena i sur. (2008) da koncentracije konvencionalnih one iš iva a nisu dobar pokazatelj one iš enja morskog okoliša. Prema tome, potrebno je raditi na prepoznavanju toksi nih tvari koje mogu zna ajno poremetiti zdravlje okoliša, a ne ulaze u standardne analize primarnih one iš iva a. Na primjer, prema radu Gomez-Gutierrez i sur. (2007), toksi nost koju u sedimentu iz Mediterana uzrokuje DDT je vrlo velika, unato tome što je proizvodnja i upotreba tog sinteti kog pesticida ve godinama ograni ena. Kao neke od naj eš ih postojanih one iš iva a oceana i obala diljem svijeta Moore (2008) navodi sinteti ke polimere, tj. plastiku, koja, osim što sadrži visoke koncentracije bioaktivnih monomernih aditiva koji se ispiru u okoliš (npr. UV-stabilizatori, omekšiva i, usporiva i plamena, bojila), može biti i izvor adsorbiranih hidrofobnih one iš iva a. U sjeverozapadnom Mediteranu plastika ini ve i dio otpadaka, i to u prosjeku oko 77% (Goldberg 1995).

Komet test na PLHC-1 stanicama potvrdio se kao osjetljiva metoda prepoznavanja genotoksi nog u inka složenih smjesa one iš iva a iz prirode. Me utim, usporedba rezultata izme u malobrojnih istraživanja genotoksi nog potencijala koja uklju uju komet test na odre enoj stani noj liniji otežana je zbog korištenja razli itih laboratorijskih protokola te mjerenja razli itih parametara ošte enja DNA (% DNA u repu, dužina repa, repni moment). Potreba za standardizacijom komet testa na uobi ajeno korištenim vrstama i tipovima stanica radi njegove upotrebe kao biomarkera genotoksi nosti ve je naglašavana (Kim i Hyun 2006; Frenzilli i sur. 2009). S ciljem lakše usporedbe rezultata dobivenih u razli itim istraživanjima, izra unat je induksijski faktor (IF), koji pokazuje koliko je puta ošte enje DNA kod tretiranih grupa ve e u odnosu na negativnu kontrolu, te induksijski faktor ovisan o koncentraciji (CDI),

koji objedinjuje sve koncentracije i odgovarajuće induksijske faktore (u obzir su uzete četiri koncentracije između 2,5 i 20 mg/mL zbog usporedbe rezultata sa rezultatima drugih autora). U ovom je radu referentna postaja (Kostrena) najveću genotoksičnost postigla kod koncentracije 20 mg/mL s IF-om od 1,84, dok je kod najone ispitane postaje (Rafinerija Ina) najveće oštećenje DNA zabilježeno kod koncentracije 1,25 mg/mL s IF-om od 3,68. Rocha i sur. (2009) dobili su slične rezultate kod analize ekstrakata sedimenta iz rijeke Tiete (Brazil) komet testom na staničnoj liniji riba RTL-W1. Prema tom istraživanju, referentna postaja je najveći IF od 1,4 postigla kod koncentracije 25 mg/mL, dok je postaja s najjačim genotoksičnim učinkom pokazala najveći IF od 3,8 kod koncentracije 1,5 mg/mL. Kod određivanja CDI-faktora u obzir su uzete četiri koncentracije, kao u radu Seitz i sur. (2008), te su opažene slične vrijednosti između postaje Rafinerija Ina (2,27) i postaje Ehingen na Dunavu (2,75), koja je u radu Keiter i sur. (2009) okarakterizirana kao jako toksična.

Kako bi razjasnili koja grupa one ispitivane, prema stupnju polarnosti, ima veći udio u genotoksičnom odgovoru, uzorci sedimenta s postaje Rafinerija Ina ekstrahirani su različitim otapalima, i to metanolom koji je polarno otapalo, diklormetanom i cikloheksanom koji su nepolarna otapala, te diklormetan-metanolom za ekstrakciju širokog spektra one ispitivane. Uzorci ekstrahirani nepolarnim otapalima pokazali su jači genotoksični odgovor od uzoraka ekstrahiranih polarnim otapalom, dok su najjači genotoksični u inak pokazali uzorci ekstrahirani diklormetan-metanolom. Prema tim rezultatima mogli bi zaključiti da nepolarne tvari u analiziranom sedimentu više doprinose oštećenju DNA nego polarne tvari. Vahl i sur. (1997) su prilikom analize sedimenta rijeke Elbe (Njemačka) Ames testom utvrdili veći i mutageni potencijal ekstrakata dobivenih s toluenom (manje polarno otapalo) od ekstrakata dobivenih s metanolom. Picer i sur. (2001) pak navode da je mutagenost dobivena Ames testom kod uzoraka sedimenta iz srednjeg Jadrana ekstrahiranih s metanolom veća nego kod uzoraka ekstrahiranih s petrolej-eterom (manje polarno otapalo). Ames testom je kod uzoraka sedimenta iz rijeke Kanawha (SAD) također utvrđeno da ekstrakti dobiveni s acetonom i metanolom (polarniji) sadrže više mutagenih tvari nego ekstrakti dobiveni s metilen-kloridom (manje polarni), dok ekstrakti dobiveni s Freonom-113 (nepolarni) uopće nisu pokazali mutagenu aktivnost (Waldron i White 1989). Kammann i sur. (2004) su ekstrakte uzoraka sedimenta iz Sjevernog i Baltičkog mora frakcionirali prema polarnosti te ispitali komet testom na EPC staničnoj liniji. Rezultati su pokazali da je toksični potencijal izraženiji u frakcijama s većom polarnosti, u kojima nije ustanovljena koncentracija PAH-ova i PCB-a,

nego u onim frakcijama koje sadrže PAH-ove i PCB-e, ali su manje polarne. Razlog različitih rezultata o glavnom uzroku toksičnosti između različitih istraživanja može biti drugačiji sastav PAH-ova u sedimentu, nedovoljna enzimatska aktivnost stanica koja je potrebna za metaboličku aktivaciju da bi one išle i kao PAH-ovi postali genotoksični, kao i prisutnost ostalih spojeva koji nisu analizirani a imaju genotoksični učinak.

5. ZAKLJUČAK

Kada se analiziraju uzorci iz okoliša kod kojih se očekuje širok spektar poznatih i nepoznatih onečišćivača, uz standardne kemijske analize potrebno je provesti i niz brzih, pouzdanih i jeftinih biotestova koji bi mogli dati što cjelovitiji odgovor na pitanje o mogućem štetnom učinku tih uzoraka iz okoliša na organizme u njemu. Jedan od tih biotestova, zbog svoje osjetljivosti i jednostavne provedbe, svakako bi mogao biti i komet test na staničnoj liniji PLHC-1, koja se pokazala kao pogodan biološki materijal za utvrđivanje genotoksičnog potencijala.

Organski ekstrakti uzoraka sedimenta prikupljenih u Riječkom zaljevu primjenom komet testa na PLHC-1 stanicama pokazali su DNA oštećenje ovisno o koncentraciji. Šest istraživanih postaja pokazalo je različite genotoksičnosti u inak, i to redom od postaje s najvećom genotoksičnošću do postaje s najmanjom genotoksičnošću: Rafinerija Ina, Terminal Bakar, Luka Rijeka, Brodogradilište 3. Maj, ACI Opatija, Kostrena.

Rezultati uzoraka sedimenta s postaje Rafinerija Ina ekstrahiranih različitim otapalima pokazali su da je dobivena genotoksičnost većinom uzrokovana nepolarnim spojevima prisutnim u uzorkovanim sedimentima.

6. LITERATURA

- Anderson S., Sadinski W., Shugart L., Brussard P., Depledge M., Ford T., Hose J., Stegeman J., Suk W., Wirgin I., Wogan G. (1994): Genetic and molecular toxicology: a research framework. *Environ. Health Perspect.* 102: 3-8.
- Avishai N., Rabinowitz C., Moiseeva E., Rinkevich B. (2002): Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an *in vitro* cellular assay. *Mutat. Res.* 518: 21-37.
- Babich H., Rosenberg D. W., Borenfreund E. (1991): *In vitro* cytotoxicity studies with the fish hepatoma cell line, PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21: 327-336.
- Bihari N., Fafan el M., Piškur V. (2007): Polycyclic aromatic hydrocarbons and ecotoxicological characterization of seawater, sediment, and mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Gulf of Rijeka, the Adriatic Sea, Croatia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 379-387.
- Bols N. C., Dayeh V. R., Lee L. E. J., Schirmer K. (2005): Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology*. U: Mommsen T. P., Moon T. W. (ur.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* 6, *Environ. Toxicol.*, Elsevier B. V., str. 43-84.
- Chapman P. M., Long E. R. (1983): The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 14: 81-84.
- Collins A. R. (2004): The comet assay for DNA damage and repair (Review). *Mol. Biotech.* 26: 249-261.
- Cotelle S., Ferard J. F. (1999): Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ. Mol. Mutagen.* 34: 246-255.
- Cvitkovi E. (2005): Statistical chronicle of the Primorsko-goranska County, str. 456.

- Davoren M., Ni Shuilleabhain S., Hartl M.G. J., Sheehan D., O'Brien N. M., O'Halloran J., Van Pelt F. N. A. M., Mothersill C. (2005): Assessing the potential of fish cell lines as tools for the cytotoxicity testing of estuarine sediment aqueous elutriates. *Toxicol. In Vitro* 19: 421-431.
- Devaux A., Personen M., Monod G. (1997): Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* 11: 71-79.
- Fairbairn D. W., Olive P. L., O'Neill K. L. (1995): The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339: 37-59.
- Fent K. (2001): Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol. In Vitro* 15: 477-488.
- Fent K., Hunn J. (1996): Cytotoxicity of organic environmental chemicals to fish liver cells (PLHC-1). *Mar. Environ. Res.* 42: 377-382.
- Frenzilli G., Nigro M., Lyons B. P. (2009): The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments: an overview. *Mutat. Res.* 681: 80-92.
- Goldberg E. D. (1995): Emerging problems in the coastal zone for the twenty-first century. *Mar. Pollut. Bull.* 31: 152-158.
- Gomez-Gutierrez A., Garnacho E., Bayona J. M., Albaiges J. (2007): Screening ecological risk assessment of persistent organic pollutants in mediterranean sea sediments. *Environ. Int.* 33: 867-876.
- Guzzella L., De Paolis A. (1994): Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Adriatic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 28: 159-165.
- Hahn M. E., Lamb T. M., Schultz M. E., Smolowitz R. M., Stegeman J. J. (1993): Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in an

- Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). *Aquat. Toxicol.* 26: 185-208.
- Hartmann A., Aquarell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice R. R. (2003): Recommendation for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18: 45-51.
- Huuskonen S., Koponen K., Ritola O., Hahn M., Lindström-Seppä P. (1998a): Induction of CYP1A and porphyrin accumulation in fish hepatoma cells (PLHC-1) exposed to sediment or water from a PCB-contaminated lake (Lake Kernaala, Finland). *Mar. Environ. Res.* 46: 379-384.
- Huuskonen S. E., Ristola T. E., Tuvikene A., Hahn M. E., Kukkonen, J. V. K., Lindstrom-Seppä P. (1998b): Comparison of two bioassays, a fish liver cell line (PLHC-1) and a midge (*Chironomus riparius*), in monitoring freshwater sediments. *Aquat. Toxicol.* 44: 47-67.
- Huuskonen S. E., Tuvikene A., Trapido M., Fent K., Hahn M. E. (2000): Cytochrome P4501A induction and porphyrin accumulation in PLHC-1 fish cells exposed to sediment and oil shale extracts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38: 59-69.
- Kamer I., Rinkevich B. (2002): *In vitro* application of the comet assay for aquatic genotoxicity: considering a primary culture versus a cell line. *Toxicol. In Vitro* 16: 177-184.
- Kammann U., Biselli S., Huhnerfuss H., Reineke N., Theobald N., Vobach M., Wosniok W. (2004): Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environ. Pollut.* 132: 279-287.
- Kammann U., Bunke M., Steinhart H., Theobald N. (2001): A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutat. Res.* 498: 67-77.

- Kammann U., Riggers C. J., Theobald N., Steinhart H. (2000): Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. *Mutat. Res.* 467: 161-168.
- Keiter S., Braunbeck T., Heise S., Pudenz S., Manz W., Hollert H. (2009): A fuzzy logic-classification of sediments based on data from *in vitro* biotests. *J. Soils Sediments* 9: 168-179.
- Kim I. Y., Hyun C. K. (2006): Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64: 288–297.
- Kosmehl T., Krebs F., Manz W., Erdinger W., Braunbeck T., Hollert H. (2004): Comparative genotoxicity testing of Rhine river sediment extracts using the Comet assay with permanent fish cell lines (RTG-2 and RTL-W1) and the Ames test. *J. Soils Sediments* 4: 84-94.
- Kurelec B. (1993): The genotoxic disease syndrome. *Mar. Environ. Res.* 35: 341-348.
- Lee R. F., Steinert S. (2003): Use of the single gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* 554: 43-64.
- Magi E., Bianco R., Ianni C., Di Carro M. (2002): Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the Adriatic Sea. *Environ. Pollut.* 119: 91-98.
- McCauley D. J., DeGraeve G. M., Linton T. K. (2000): Sediment quality guidelines and assessment: overview and research needs. *Environ. Sci. Pol.* 3: 133-144.
- Mitchelmore C. L., Chipman J. K. (1998): DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.* 399: 135-147.
- Moore C. J. (2008): Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. *Environ. Res.* 108: 131-139.

- Nehls S., Segner H. (2001): Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the Comet assay. *Environ. Toxicol.* 16: 321-329.
- Nehls S., Segner H. (2005): Comet assay with the fish cell line rainbow trout gonad-2 for *in vitro* genotoxicity testing of xenobiotics and surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 2078-2087.
- Notar M., Leskovšek H., Faganeli J. (2001): Composition, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 36-44.
- Picer M., Kova T., Britvi S., Picer N. (2001): The chemical and biogenotoxic characterization of organic xenobiotics in aquatic sediment materials: 1. The application and comparison of chemically non-specific and biogenotoxic methods. *Chemosphere* 44: 1673-1683.
- Pichardo S., Jos A., Zurita J. L., Salguero M., Camean A. M., Repetto G. (2005): The use of the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1 to compare the toxic effects produced by microcystins LR and RR. *Toxicol. In Vitro* 19: 865-873.
- Rau M. A., Whitaker J., Freedman J. H., Di Giulio R. T. (2004): Differential susceptibility of fish and rat liver cells to oxidative stress and cytotoxicity upon exposure to prooxidants. *Toxicol. Pharmacol.* 137: 335-342.
- Reid B. J., Jones K. C., Semple K. T. (2000): Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments - a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environ. Pollut.* 108: 103-112.
- Rocha P. S., Luvizotto G. L., Kosmehl T., Böttcher M., Storch V., Braunbeck T., Hollert H. (2009): Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): *In vitro* Comet assay versus in situ micronucleus assay studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 1842-1848.

- Rojas E., Lopez M. C., Valverde M. (1999): Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr.* 772: 225-254.
- Schlenk D., Rice C. D. (1998): Effect of zinc and cadmium treatment on hydrogen peroxide-induced mortality and expression of glutathione and metallothionein in a teleost hepatoma cell line. *Aquat. Toxicol.* 43: 121-129.
- Schnurstein A., Braunbeck T. (2001): Tail moment versus tail length—application of an *in vitro* version of the Comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49: 187-196.
- Seitz N., Böttcher M., Keiter S., Kosmehl T., Manz W., Hollert H., Braunbeck T. (2008): A novel statistical approach for the evaluation of Comet assay data. *Mutat. Res.* 652: 38-45.
- Shahidul Islam M., Tanaka M. (2004): Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 48: 624-649.
- Shugart L. R., Theodorakis C. (1994.): Environmental genotoxicity: probing the underlying mechanisms. *Environ. Health Perspect.* 102: 13-17.
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
- Sullivan C., Mitchelmore C. L., Hale R. C., Van Veld P. A. (2007): Induction of CYP1A and DNA damage in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to biosolids. *Sci. Tot. Environ.* 384: 221-228.
- Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.-C., Sasaki Y. F. (2000): Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 206-221.

- Traven L., Žaja R., Lončar J., Smital T., Miović V. (2008): CYP1A induction potential and the concentration of priority pollutants in marine sediment samples – *In vitro* evaluation using the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Toxicol. In Vitro* 22: 1648-1656.
- Vahl H. H., Karbe L., Westendorf J. (1997): Genotoxicity assessment of suspended particulate matter in the Elbe river: comparison of Salmonella microsome test, arabinose resistance test, and *umu*-test. *Mutat. Res.* 394: 81-93.
- Waldron M. C., White A. R. (1989): Non-volatile Chemical Mutagens in Sediments of the Kanawha River, West Virginia. *Ohio J. Sci.* 5: 176-180.
- WHO (1993): Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concept and principles. World Health Organisation, Geneva.
- Zhou B., Liu C., Wang J., Lam P. K. S., Wu R. S. S. (2006): Primary cultured cells as sensitive *in vitro* model for assessment of toxicants – comparison to hepatocytes and gill epithelia. *Aquat. Toxicol.* 80: 109-118.
- ACI (2010): ACI marina Opatija, ACI - Adriatic Croatia International Club, <http://www.aci-club.hr/marina.asp?ma=opatija>; pristupljeno 10. 6. 2010.
- INA (2010): Industrija nafte d.d., <http://www.ina.hr/default.aspx?id=37>; pristupljeno 12. 6. 2010.
- Luka uprava Rijeka (2010), Terminali, <http://www.portauthority.hr/rijeka/terminali>; pristupljeno 10. 6. 2010.
- Made in Croatia (2010), Brodogradilište 3. Maj, <http://www.made-in-croatia.com.hr/index.php?inc=KVA-TankerVisenamjenski>; pristupljeno 12. 6. 2010.
- Općina Kostrena Online (2010), Prostorni plan Općine Kostrena, <http://www.kostrena.hr/ContentDetails.aspx?gcgid=02f95c10-b7da-4286ae3380b0a5e67968&gcid=02d10e6d-eb21-40d0-a5fb-9b468fb3e337>; pristupljeno 10. 6. 2010.